



Confinement moléculaire et organisation de la membrane des cellules vivantes: analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence

Laure Wawrezinieck

► To cite this version:

Laure Wawrezinieck. Confinement moléculaire et organisation de la membrane des cellules vivantes: analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2006. Français. NNT : . tel-00097010

HAL Id: tel-00097010

<https://theses.hal.science/tel-00097010>

Submitted on 20 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

2006AIX2XXXX

THÈSE

présentée et soutenue publiquement par

Laure WAWREZINIECK

le 18 septembre 2006

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ AIX-MARSEILLE II

**Confinement moléculaire et organisation de la
membrane des cellules vivantes : analyse de la
diffusion par spectroscopie de corrélation de
fluorescence**

Discipline : Biologie des Eucaryotes (option Immunologie)

École Doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

Composition du Jury :

Philippe NAQUET	(Président du Jury)
Laurence SALOMÉ	(Rapporteur)
Patrick TAUC	(Rapporteur)
Didier MARGUET	(Directeur de thèse)
Pierre-François LENNE	(Co-directeur de thèse)
Hervé RIGNEAULT	

2006AIX2XXXX

THÈSE

présentée et soutenue publiquement par

Laure WAWREZINIECK

le 18 septembre 2006

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ AIX-MARSEILLE II

**Confinement moléculaire et organisation de la
membrane des cellules vivantes : analyse de la
diffusion par spectroscopie de corrélation de
fluorescence**

Discipline : Biologie des Eucaryotes (option Immunologie)

École Doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé

Composition du Jury :

Philippe NAQUET	(Président du Jury)
Laurence SALOMÉ	(Rapporteur)
Patrick TAUC	(Rapporteur)
Didier MARGUET	(Directeur de thèse)
Pierre-François LENNE	(Co-directeur de thèse)
Hervé RIGNEAULT	

Remerciements

À écrire après la soutenance

Table des matières

Introduction	1
---------------------	----------

Chapitre 1

Membrane biologique et diffusion

1.1 Historique de la représentation de la membrane biologique	6
1.2 Les constituants de la membrane plasmique	11
1.3 Le cytosquelette	20
1.4 Les radeaux lipidiques	32
1.5 Le travail réalisé sur membranes modèles	48

Chapitre 2

La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence

2.1 La fluorescence	59
2.2 Principe de la FCS et calcul théorique de l'ACF	68
2.3 Montage utilisé	79
2.4 Avantages de la FCS	84
2.5 Les applications de la FCS	85
2.6 Les difficultés liées à l'utilisation de la FCS	90

Chapitre 3

Méthode expérimentale

3.1 FCS à une échelle spatiale sur une membrane cellulaire	92
3.2 FCS à différentes échelles spatiales	96
3.3 Calibration sur une membrane modèle : mesures sur GUVs	105
3.4 FCS à différentes échelles spatiales sur une membrane cellulaire	107

Chapitre 4

Simulations

4.1 Article paru dans Biophysical Journal	109
---	-----

4.2	Réflexions sur la diffusion dans des domaines isolés	124
Chapitre 5		
Résultats expérimentaux		
5.1	Globules rouges	128
5.2	Cellules eucaryotes à l'état d'équilibre : travail sur les cellules COS-7	137
5.3	Cellules eucaryotes après un événement de signalisation	159
Conclusion		175
Annexe A Cellules COS-7 : protocoles expérimentaux		179
Annexe B Globules rouges : protocoles expérimentaux		185
Annexe C Résultats expérimentaux		189
Bibliographie		193

Table des figures

1.1	Microscope de Hooke	7
1.2	Membrane cellulaire : modèle de la bicouche lipidique	8
1.3	Modèles de Danielli/Davson et de Robertson	8
1.4	Modèle de Singer et Nicolson	10
1.5	Modèles de membrane non homogène	11
1.6	Structure des trois grandes catégories de phospholipides	12
1.7	Exemples de glycérophospholipides	13
1.8	Exemples de sphingolipides	14
1.9	Structure du cholestérol et insertion dans la membrane	15
1.10	Composition lipidique de la membrane du globule rouge humain	15
1.11	Transitions de phase de la phosphatidylcholine	17
1.12	Mouvements autorisés des lipides au sein d'une bicouche en phase fluide	18
1.13	Modes d'ancrage des protéines à la membrane	19
1.14	Architecture du cytosquelette de cellules épithéliales	21
1.15	Agencement des filaments d'actine	23
1.16	Mécanismes de polymérisation de l'actine	24
1.17	Drogues agissant sur les microfilaments d'actine	25
1.18	Cytosquelette des globules rouges	27
1.19	Expériences de SPT réalisées sur les globules rouges	29
1.20	Expériences de SPT sur cellules NRK	31
1.21	Modèle de radeau lipidique selon Simons et Ikonen	33
1.22	Modèles possibles de membrane contenant des radeaux lipidiques	35
1.23	Structures de deux détergents	36
1.24	Principe du FRAP	41
1.25	FRAP à rayon variable : lois de diffusion obtenues par Edidin	43
1.26	Structure des bicouches lipidiques	49
1.27	Diagrammes de phase de mélanges binaires	51
1.28	Diagramme de phase d'un mélange ternaire	53
2.1	Niveaux d'énergie d'une molécule diatomique	60
2.2	Diagramme de Jablonski	61
2.3	Spectres d'absorption et d'émission de la Rhodamine 6G	62
2.4	Exemples de fluorophores utilisés pour la fabrication d'analogues lipi- diques fluorescents	66

2.5	Structure moléculaire de la GFP	66
2.6	Principe de la transfection	67
2.7	ACF et état triplet de la Rhodamine 6G	76
2.8	Effet du temps mort d'un détecteur unique sur la forme de l'ACF . .	77
2.9	ACF théorique pour une espèce diffusante	79
2.10	Montage classique de FCS	80
2.11	Caractéristiques du miroir dichroïque	80
2.12	Ouverture numérique et PSF	83
2.13	Filtrage spatial par le trou confocal	83
2.14	Mesure d'un taux de réaction par FCS	86
2.15	Mesure d'un taux de réaction par FCCS à deux couleurs	87
2.16	FCS sur membranes modèles	88
2.17	Forme des ACFs pour différents types de diffusion	89
3.1	Positionnement de la membrane dans le volume confocal	93
3.2	Ajustement d'une ACF obtenue pour FL-G _{M1}	94
3.3	Ajustement d'une ACF obtenue pour TfR-GFP	95
3.4	Télescope variable et modification du volume confocal	97
3.5	Diaphragme variable et modification du volume confocal par utilisation d'un diaphragme variable	98
3.6	Configuration permettant de calculer l'effet du diaphragme	98
3.7	Calcul vectoriel du volume d'excitation	100
3.8	Calcul vectoriel du volume de collection	101
3.9	Calcul vectoriel du volume de détection	102
3.10	Profil du volume de détection	103
3.11	Mesure de la forme du volume confocal avec des microsphères	105
3.12	Loi de diffusion de FL-PC dans des GUVs	106
3.13	Lois de diffusion FCS de FL-G _{M1} et TfR-GFP	107
4.1	Introduction de la notion d'indice de confinement	125
5.1	Structure des analogues fluorescents utilisés pour l'étude des globules rouges	129
5.2	Effet de l'osmolarité sur la forme des globules rouges	130
5.3	ACFs mesurées dans les globules rouges	131
5.4	Lois de diffusion FCS dans les globules rouges	132
5.5	Structure de l'amphotéricine B et de la nystatine	133
5.6	Lois de diffusion FCS pour FL-MA dans les globules rouges, après traitements du cytosquelette de spectrine	134
5.7	Lois de diffusion FCS pour les lipides FL-G _{M1} , FL-SM et FL-PC dans les globules rouges, après traitements du cytosquelette de spectrine .	135
5.8	Lois de diffusion et taille du réseau de spectrine	135
5.9	Molécules étudiées par FCS	137

5.10	Structure des analogues fluorescents utilisés pour l'étude des globules rouges	138
5.11	Modèle du double confinement par les radeaux lipidiques et le cytosquelette	139
5.12	Étude du photoblanchiment dans les cellules COS-7	152
5.13	Température et diffusion des lipides et des protéines ancrées GPI dans les COS-7	153
5.14	Température et diffusion des protéines transmembranaires dans les COS-7	154
5.15	Température et diffusion membranaire dans les 3A9	155
5.16	Sous-unité B de la toxine du choléra (CTB) et ganglioside G_{M1}	156
5.17	CTB et diffusion de GPI-GFP et FL- G_{M1}	156
5.18	Lois de diffusion échange/confinement	158
5.19	Principe de la mesure FCS à travers un nanotrou	159
5.20	Loi de diffusion FCS complétée aux petits waists : confinement	160
5.21	Lois de diffusion FCS complétée aux petits waists : échange	161
5.22	Structure du complexe TCR/CD3- ζ	162
5.23	Lois de diffusion de ζ -YFP dans les cellules 3A9 sans activation	163
5.24	Action des différentes drogues agissant sur la composition lipidique de la membrane	164
5.25	Lois de diffusion de ζ -GFP dans les cellules Jurkat sans activation	166
5.26	Lois de diffusion de ζ -YFP dans les cellules 3A9 lors de l'activation	168
5.27	Lois de diffusion de ζ -YFP dans les cellules 3A9 lors de l'activation, après différents traitements	169
5.28	Lois de diffusion de ζ -GFP dans les cellules Jurkat lors de l'activation, après différents traitements	170
5.29	Loi de diffusion obtenue dans le cas du modèle de confinement total	172
5.30	Modèle de réorganisation de la membrane lors de l'activation d'une cellule T	173

Liste des tableaux

1.1	Principaux glycérophospholipides	13
1.2	Fence skeleton model et globules rouges	29
1.3	Fence skeleton model et anchored-protein picket model	32
2.1	Brillance de quelques fluorophores	63
3.1	Inhomogénéité optique de la cellule	92

Introduction

Contexte : la biophotonique en France et l'équipe Mosaïc

Les outils de la physique sont aujourd'hui entrés dans nombre de laboratoires de biologie : les microscopes optiques ou électroniques sont désormais utilisés quotidiennement. La physique fournit à la biologie une instrumentation optique toujours plus performante et des techniques très variées. La biophotonique couvre l'ensemble des technologies qui permettent d'exploiter la lumière dans le domaine du vivant.

Voici différents exemples de l'utilisation de la lumière pour mieux comprendre ou agir sur un objet biologique.

Les techniques de diagnostic utilisant la lumière Il s'agit de sonder la structure et la fonction des tissus en utilisant les variations de certaines propriétés mesurables de la lumière telles que l'absorption, l'émission de fluorescence et la diffusion Raman élastique ou inélastique. Ces procédés permettent la détection précoce de la maladie, l'observation des fonctions tissulaires normales et anormales et l'orientation des traitements. Les techniques de la photonique sont très utilisées car elles sont peu invasives.

L'utilisation thérapeutique de la lumière Il s'agit de concevoir les techniques et les instruments permettant d'exploiter les effets photochimiques, photothermiques et photomécaniques de la lumière sur les cellules et les tissus. Les techniques et les instruments développés sont à la base de toutes les thérapies reposant sur la lumière : thérapie photodynamique par des médicaments photoactivés, chirurgie au laser et modification *in situ* de matériaux biologiques.

La lumière utilisée pour l'analyse biologique Il s'agit de mettre au point de nouvelles classes de microscopes optiques, la micromanipulation au laser de cellules et d'organites, l'imagerie des mécanismes génétiques par bioluminescence et fluorescence et la création de techniques d'analyse rapide des cellules et des gènes.

Toutes ces applications sont tributaires de l'élaboration et de l'intégration de nouvelles technologies. Elles exigent une compréhension approfondie de l'interaction de la lumière avec les molécules biologiques, les cellules et les tissus. La biophotonique est un domaine intrinsèquement multidisciplinaire qui appelle une étroite collaboration

des physiciens, des ingénieurs, des biologistes, des spécialistes des biotechnologies, des chimistes et des cliniciens. Ce travail de collaboration, nécessaire mais difficile à mettre en place, n'en est encore qu'à ses débuts... mais les sigles barbares associés à toutes les techniques proposées par le physicien sont déjà nombreuses : FRAP, FCS, FRET, FLIM, FLIP, STED, etc.

Deux axes de recherche peuvent être suivis par le physicien cherchant à aider le biologiste. Il est d'une part possible de développer de nouveaux outils. Un bon exemple de nouvel outil est aujourd'hui le 4π -microscope inventé par C.J.R. Sheppard, développé par S. Hell et commercialisé par Leica, qui permet une grande avancée en réduisant la taille minimale du volume d'observation. Cependant, il représente un investissement très lourd, et peu de laboratoires peuvent encore en disposer. Il est d'autre part possible d'améliorer l'utilisation des outils déjà présents dans les laboratoires de biologie, afin d'optimiser les informations obtenues ou encore d'en obtenir davantage. Les intérêts sont d'abord que la propagation de la nouvelle méthode est très rapide, puisque ne nécessitant souvent qu'un investissement supplémentaire minime ; ensuite, les utilisateurs connaissant déjà les appareils, la durée de formation nécessaire est très courte. C'est cette démarche qui a été choisie dans le cadre de cette thèse.

Le travail de thèse présenté ici a été effectué au sein de l'équipe Mosaïc, née de la collaboration entre le Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy et l'Institut Fresnel. Il s'agissait d'utiliser les compétences développées à l'Institut Fresnel en terme de détection de molécule unique et de microscopie optique, afin de mieux comprendre l'architecture de la membrane cellulaire.

L'idée fondamentale de cette thèse est de développer une utilisation plus rationnelle d'outils optiques déjà existants : la microscopie confocale associée à la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS, pour *Fluorescence Correlation Spectroscopy*). Ces outils sont très répandus dans les laboratoires de biophysique ou de biologie, mais souvent sous-exploités, voire mal exploités, conduisant dans ce dernier cas à des résultats faux.

La FCS analyse les fluctuations de la fluorescence émise par un petit ensemble de molécules et combine une grande sensibilité avec une très bonne statistique. Elle permet la détermination de nombreux paramètres physiques, tels que les concentrations locales, les coefficients de diffusion et les constantes de réactions faisant intervenir des molécules fluorescentes. Les mesures peuvent être réalisées à très faibles concentrations, dans des conditions d'équilibre thermodynamique local.

Nous nous intéresserons ici plus précisément à l'étude de la diffusion qui peut être réalisée grâce à la technique de FCS. Dans une expérience standard de FCS sont détectées les fluctuations spontanées de fluorescence provenant d'un volume d'observation de l'ordre du femtolitre défini par le montage optique confocal, avec une très bonne résolution temporelle de l'ordre de la dizaine de nanosecondes. À partir de l'étude de l'auto-corrélation temporelle des fluctuations de fluorescence, un

temps de diffusion à travers un volume d'observation peut être calculé. Si la diffusion des molécules fluorescentes est libre, il est alors possible de calculer le coefficient de diffusion. Cette opération est quotidiennement réalisée dans les laboratoires de biophysique. Cette démarche nécessite de prendre des précautions car l'hypothèse selon laquelle la diffusion des molécules fluorescentes est libre est souvent erronée. Nous nous intéressons dans ce travail à l'organisation de la membrane cellulaire et aux structures responsables d'une diffusion non libre des molécules membranaires.

Lignes directrices de ce travail de thèse

Le premier chapitre expose les différentes techniques utilisées pour étudier les membranes biologiques ainsi que les principaux modèles d'organisation membranaire proposés. Nous nous attarderons notamment sur deux modèles majeurs de confinement membranaire : le modèle de barrières à la diffusion des molécules membranaires, constituées des microfilaments d'actine du cytosquelette (le *skeleton fence model* proposé par A. Kusumi), ainsi que le modèle des radeaux lipidiques (*lipid rafts*) proposé originellement par K. Simons et G. Van Meer en 1988 mais qui a subi depuis de nombreuses modifications.

Le deuxième chapitre présente la technique de FCS déjà disponible dans de nombreux laboratoires. Il rappelle les principes de la fluorescence et de la FCS ainsi que les différents travaux réalisés grâce à cette technique.

Afin d'obtenir davantage d'informations que celles habituellement à disposition de l'expérimentateur, nous avons réalisé des mesures de temps de diffusion pour différentes tailles de volume d'observation et tracé ce que nous appellerons les *lois de diffusion FCS*, c'est-à-dire le temps de diffusion en fonction de l'aire de la surface de membrane éclairée. Tout ceci est exposé dans le troisième chapitre.

Le quatrième chapitre démontre que la mesure d'une telle loi de diffusion FCS permet de différencier les deux modèles majeurs de confinement membranaire proposés. Notre méthode a été appliquée à l'étude de la diffusion de molécules fluorescentes aussi bien dans des membranes modèles (Vésicules Géantes Unilamellaires) que dans des membranes cellulaires, à température physiologique.

Enfin, le cinquième chapitre expose les études expérimentales réalisées sur différentes membranes plasmiques de cellules vivantes. L'étude réalisée sur des globules rouges a permis de mettre en évidence l'impact de la présence du réseau de spectrine sur la diffusion de la molécule Bodipy-maléimide, alors que ce même réseau ne perturbe pas la diffusion des analogues lipidiques fluorescents.

Les mêmes études ont été réalisées sur des cellules eucaryotes : les cellules COS-7. Elles ont montré qu'à la fois le cytosquelette et les radeaux lipidiques jouent un rôle dans le confinement moléculaire. Il est notable que le confinement transitoire des molécules dans les mailles du cytosquelette dépend uniquement de la nature de l'ancrage à la membrane.

Enfin, une étude dynamique d'activation cellulaire a été réalisée : les modifications de la structure de la membrane cellulaire ont été étudiées au cours d'un événement

de signalisation. Nous avons pu montrer que l'organisation des radeaux lipidiques évolue de façon réversible lors d'un tel événement.

La technique développée dans cette thèse est très peu invasive, permettant ainsi de travailler sur cellules vivantes. Elle nous a permis de mesurer des lois de diffusion démontrant une organisation à une échelle inférieure à la longueur d'onde. Nous avons également montré que les molécules peuvent être piégées pendant des durées de l'ordre de la milliseconde, durées d'ailleurs compatibles avec des processus biologiques.

Chapitre 1

Membrane biologique et diffusion

Sommaire

1.1	Historique de la représentation de la membrane biologique	6
1.1.1	Découverte et premières observations de la cellule	6
1.1.2	Quelques modèles de membrane cellulaire jusqu'en 1972 . .	7
	Modèle d'Overton (1885-1910)	7
	Modèle de Gorter et Grendel (1937)	7
	Modèles de Danielli et Davson et modèle de Robertson (1935-1970)	8
	Modèle de Singer et Nicolson (1972)	9
	Diffusion confinée dans la membrane cellulaire	10
1.2	Les constituants de la membrane plasmique	11
1.2.1	Les lipides membranaires	11
	Les trois grandes familles de lipides membranaires	12
	Variété de la composition lipidique des membranes	15
	Propriétés physiques des membranes lipidiques	16
1.2.2	Les protéines membranaires	18
1.3	Le cytosquelette	20
1.3.1	Les différents types de cytosquelette	20
	Les microfilaments d'actine	21
	Effet des drogues sur les filaments d'actine	22
	Le cytosquelette des globules rouges	26
1.3.2	Impact de la présence des filaments d'actine sur la diffusion membranaire. Étude par SPT	27
	SPT sur globules rouges	28
	SPT sur cellules eucaryotes	30
1.4	Les radeaux lipidiques	32
1.4.1	L'hypothèse des radeaux lipidiques	32
1.4.2	Les différentes descriptions des microdomaines lipidiques . .	34
1.4.3	Méthodes utilisées pour sonder la membrane cellulaire à la recherche des domaines lipidiques	34
	Méthodes biochimiques	36

Les mesures de diffusion	38
Les méthodes locales de mesure	44
1.4.4 Rôle biologique des radeaux lipidiques	47
1.5 Le travail réalisé sur membranes modèles	48
Les phases des mélanges lipidiques	49
1.5.1 Systèmes lipidiques binaires	50
L'enthalpie libre d'interaction entre deux lipides	50
Mélange de deux types de phospholipides ayant des tem- pératures de fusion très différentes	50
Mélanges binaires avec du cholestérol	51
Les domaines de taille < 100 nm : de véritables phases thermodynamiques ?	52
Mélanges ternaires avec du cholestérol	52
Des membranes modèles aux membranes cellulaires	54
1.5.2 Les radeaux lipidiques existent-ils vraiment ?	55
Caractérisation biochimique des DRMs	55
L'utilisation de la déplétion en cholestérol	55

1.1 Historique de la représentation de la membrane biologique

1.1.1 Découverte et premières observations de la cellule

L'apparition de la notion de membrane cellulaire remonte aux premiers travaux de cytologie du XVII^e siècle et accompagne la mise en œuvre d'un des premiers microscopes (figure 1.1a). Hooke publie les observations réalisées à l'aide de ce microscope dans *Micrographia* en 1665 [Hooke 65]. On y trouve notamment la première description d'une cellule biologique, faite à partir de l'observation d'une fine lamelle de liège (figure 1.1b) :

« (...) I could exceedingly plainly perceive it to be all perforated and porous, much like a Honey-comb, but that the pores of it were not regular (...) these pores, or cells, (...) were indeed the first microscopical pores I ever saw, and perhaps, that were ever seen, for I had not met with any Writer or Person, that had made any mention of them before this (...) »

En 1839, Schwann propose la première théorie cellulaire : la cellule y est décrite comme une petite chambre limitée par une paroi. La membrane est alors considérée comme un simple sac contenant les différents constituants de la cellule. Les différentes organites cellulaires sont peu à peu découvertes au cours des XVIII^e et XIX^e siècles. Entre 1940 et 1950 apparaissent deux nouvelles techniques qui permettent des progrès rapides dans la connaissance de la structure cellulaire et de la membrane plasmique : l'*ultracentrifugation différentielle* et la *microscopie électronique*. Il est désormais possible d'isoler les constituants cellulaires, de comparer les

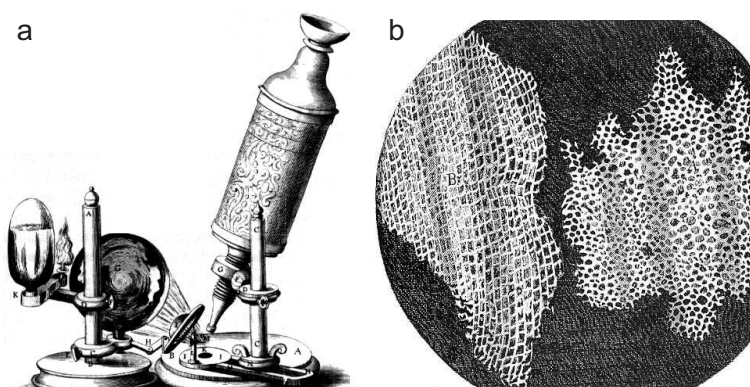


FIG. 1.1 – Microscope de Hooke : d'après [Hooke 65].

a) Le microscope composé utilisé par Hooke. Une rotule sphérique et un anneau permettent le positionnement de l'instrument. Le système optique est constitué de trois lentilles (objectif, oculaire et lentille de champ). Le système d'illumination comporte une lentille boule qui focalise la lumière d'une flamme sur l'objet observé. b) Observation d'une fine lamelle de liège à l'aide de ce même microscope.

images obtenues en microscopie électronique sur les constituants isolés et les coupes de cellules, et surtout de déterminer les activités biologiques de ces constituants.

1.1.2 Quelques modèles de membrane cellulaire jusqu'en 1972

Modèle d'Overton (1885-1910)

Cherchant des substances capables d'être absorbées par les cellules des plantes, Overton découvre que les substances non polaires passent rapidement à travers la membrane. Cette observation rend obsolète le modèle de l'époque selon lequel la membrane n'est perméable qu'à l'eau. À partir de ces études, Overton propose deux hypothèses préliminaires [Overton 99] : (i) il existe des similitudes entre les membranes cellulaires et les lipides tels que ceux présents dans l'huile d'olive ; (ii) certaines molécules – les lipides – passent à travers la membrane en se “dissolvant” à l'intérieur de la membrane, constituée elle-même de lipides.

En 1917, Langmuir formule l'hypothèse selon laquelle les lipides forment une monocouche sur l'eau en s'orientant verticalement, leur chaînes carbonées étant hors de l'eau alors que leurs groupements polaires restent en contact avec la surface de l'eau.

Modèle de Gorter et Grendel (1937)

En 1925, Gorter et Grendel solubilisent les lipides d'un globule rouge à l'aide d'acétone [Gorter 25]. En utilisant une cuve de Langmuir, ils mesurent la superficie de la monocouche de lipides ainsi formée. Parallèlement, ils évaluent la surface d'un globule rouge en supposant qu'il a une forme sphérique. La surface calculée d'un globule rouge est alors égale à la moitié de la superficie mesurée de la monocouche

de lipides provenant de ce globule rouge ; ils concluent que la membrane est une double couche de lipides¹ (figure 1.2).

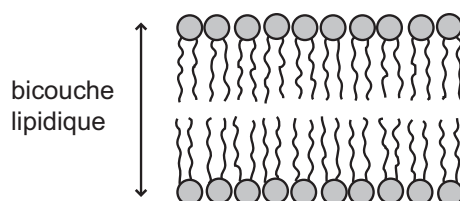


FIG. 1.2 – Bicouche lipidique. Modèle de Gorter et Grendel, 1937

Modèles de Danielli et Davson et modèle de Robertson (1935-1970)

Le modèle de bicouche lipidique ne permet pas d'expliquer que la tension superficielle de l'interface membrane-eau est toujours inférieure à celle d'une interface huile-eau. La faible tension superficielle de l'interface membrane-eau ne peut s'expliquer si la membrane ne contient que des lipides ; au contraire, lorsque des protéines sont ajoutées à l'huile ou l'eau, elles adsorbent à l'interface et induisent une réduction de la tension superficielle de l'interface huile-eau. Ces différentes observations ont conduit Danielli et Davson à proposer un nouveau modèle en 1935 [Danielli 35], dans lequel les protéines sont parties intégrantes de la membrane. Chaque côté de la bicouche lipidique est recouvert d'un manteau de protéines globulaires, les protéines étant attachées par des liaisons ioniques aux têtes polaires des lipides (figure 1.3a). Ce modèle est étendu quelques années plus tard à des protéines dépliées et qui peuvent constituer un fin manteau protéique en contact étroit avec les lipides.

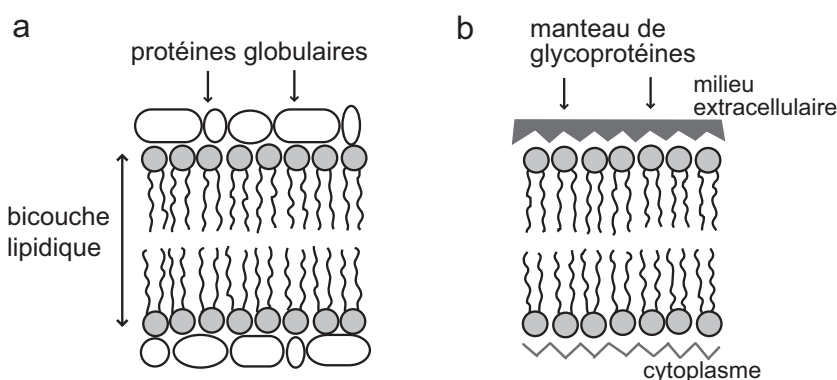


FIG. 1.3 – Modèles de membrane cellulaire.

a) Modèle de Danielli et Davson, 1935. b) Modèle de Robertson, 1964.

¹La sous-estimation de la surface du globule rouge liée à l'hypothèse erronée sur sa forme n'a été sans conséquence que parce que l'extraction des lipides par l'acétone était incomplète : les deux erreurs se compensaient !

Ce modèle semble confirmé par les premières images de microscopie électronique obtenues par Robertson [Robertson 59] : la membrane est une structure de 7-8 nm d'épaisseur en trois lames (deux lignes noires supposées être les protéines entourent une zone claire correspondant à la bicouche lipidique). Ces images montrent également que la membrane biologique est asymétrique et que toutes les membranes des cellules ont la même composition.

De nombreuses observations mettent néanmoins à mal ce modèle de *membrane unité* [Robertson 64], représenté sur la figure 1.3b. D'abord, les membranes ne sont pas symétriques et le rapport du nombre de lipides sur le nombre de protéines change d'une cellule à l'autre. Ensuite, cette structure paraît instable : les protéines membranaires sont amphiphiles et leurs zones hydrophobes se trouvent selon ce modèle dans un environnement aqueux ; un manteau protéique sépare de l'eau les têtes polaires des lipides. D'autre part, les images obtenues par la technique de cryo-fracture [da Silva 70] semblent indiquer que des protéines sont incluses à l'intérieur de la bicouche lipidique². Enfin, ce modèle donne également une image statique des composants de la membrane. Or les expériences de Frye et Edidin [Frye 70] mettent en évidence la fluidité de la membrane et la mobilité des protéines membranaires³.

Modèle de Singer et Nicolson (1972)

Singer et Nicolson partent du modèle de la bicouche lipidique de Gorter et Grendel et utilisent les découvertes de Frye et Edidin en matière de fluidité de la membrane et de mobilité des protéines. Ce modèle de la *mosaïque fluide* [Singer 72] reste le modèle de référence, même s'il a subi quelques aménagements. La membrane plasmique y est décrite comme une bicouche lipidique fluide dans laquelle flottent des protéines :

« a two dimensional oriented solution of integral proteins (...) in the viscous phospholipid bilayer. »

Dans le modèle original de Singer et Nicolson, lipides et protéines sont distribués plus ou moins aléatoirement. Les protéines sont insérées plus ou moins profondément dans la bicouche lipidique sous forme compacte : les protéines peuvent être intégrales (protéines transmembranaires) ou adsorbées à la surface de la bicouche. Les chaînes polypeptidiques, le plus souvent organisées sous forme d'hélices α [Unwin 84] et contenant de nombreux résidus d'acides aminés hydrophobes, prennent la place des lipides et assurent ainsi la continuité de la partie hydrophobe de la membrane. Les

²La technique de cryo-fracture est sans doute la technique la mieux adaptée à la visualisation de la distribution des protéines dans la membrane cellulaire. Après une procédure de congélation rapide des cellules, la membrane est clivée dans le plan séparant les deux feuillets de la bicouche lipidique. Chaque feuillet est ensuite recouvert avec un métal lourd ; une réplique est alors fabriquée puis observée par microscopie électronique. Les protéines incluses dans la membrane sont alors bien visibles.

³Dans l'expérience de Frye et Edidin, les antigènes de surface de cellules humaines et de souris sont marqués par double immunofluorescence. Juste après la fusion des deux cellules humaines et de souris, deux hémisphères de couleurs différentes sont visibles ; pendant les minutes suivantes, les antigènes diffusent dans la membrane de la cellule hybride issue de la fusion, jusqu'à l'obtention d'une distribution aléatoire des protéines humaines et de souris.

parties les plus hydrophiles des protéines émergent sur au moins une des deux faces de la bicouche. La face externe de la membrane est rendue encore plus hydrophile par la présence de résidus osidiques (figure 1.4d). L'agitation thermique est responsable de la diffusion et de la rotation de toutes les molécules dans le plan de la membrane.

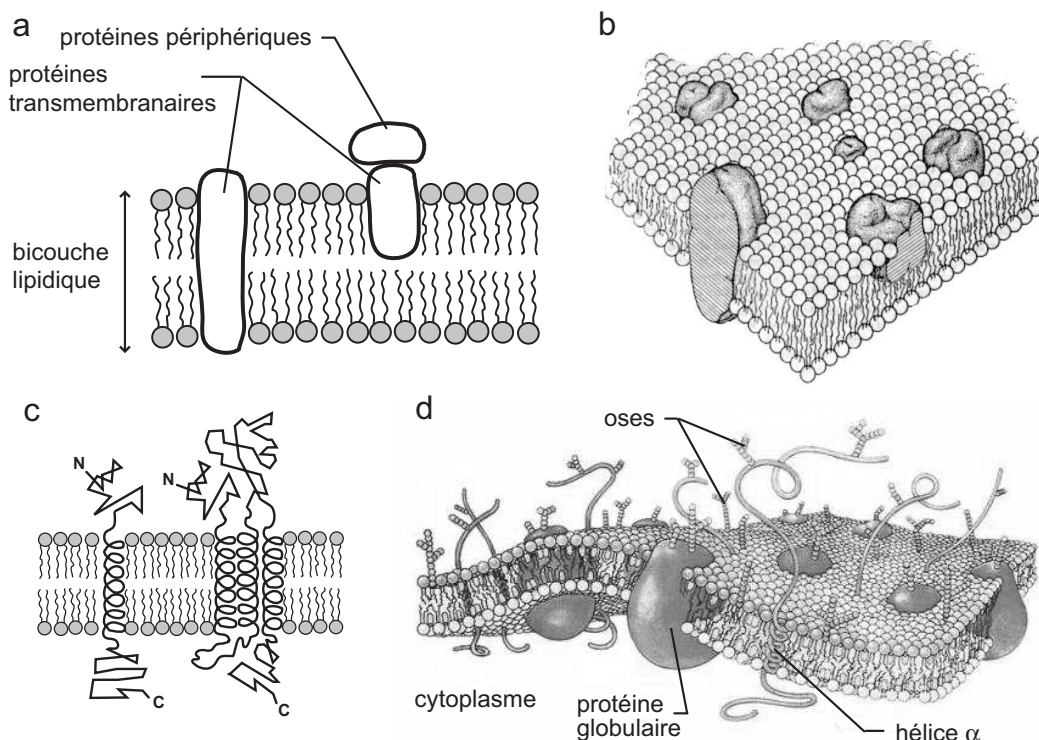


FIG. 1.4 – Modèle de Singer et Nicolson, 1972.

a) Schéma 2D. b) Schéma 3D tiré de l'article [Singer 72]. c) Hélices α proposées par Unwin et Henderson en 1984. d) Modèle amélioré de la mosaïque fluide, développé dans les années 80. Les oses sont tous situés sur le côté extracellulaire de la membrane. D'après [Bretscher 85].

Diffusion confinée dans la membrane cellulaire

L'hypothèse selon laquelle les molécules s'ordonnent aléatoirement dans la membrane est néanmoins rapidement remise en question. Dès 1974, de nombreuses données sur la distribution et la fonction des protéines membranaires indiquent que, dans une même membrane, différentes protéines peuvent être localisées dans des environnements différents. D'abord, des résultats de mesure de résonance magnétique ont mis en évidence une possible séparation de phase des lipides dans le plan de la membrane. Jain et White proposent alors un modèle de membrane possédant une organisation lipidique à longue distance [Jain 77]. La membrane est composée d'un certain nombre de plateaux lipidiques (*plate-model*) en mouvement les uns par rapport aux autres (figure 1.5a). Des bicouches ayant des compositions et des organisations différentes

peuvent coexister dans le plan de la membrane (figure 1.5b). De telles différences d'organisation sont supposées provenir de conformations moléculaires différentes et de la spécificité de certaines interactions moléculaires.

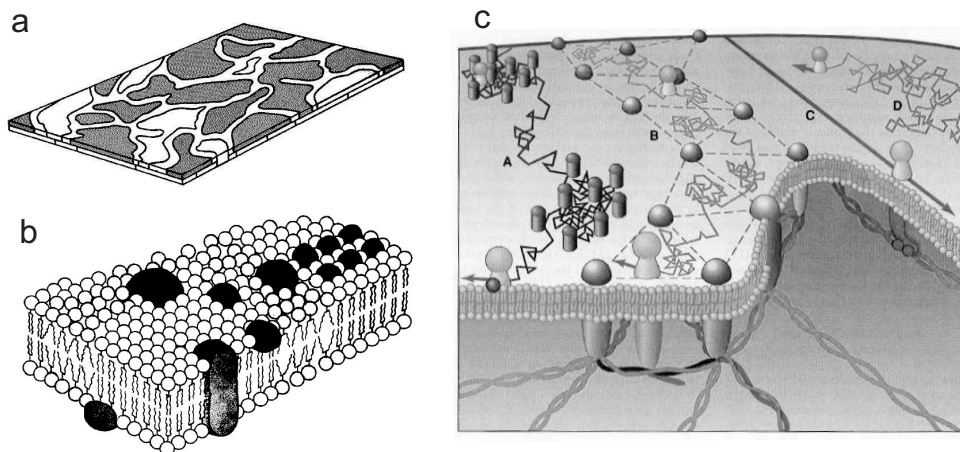


FIG. 1.5 – Modèles de membrane non homogène.

a) et b) Modèle de Jain et White, 1977. c) Modèle de Jacobson, 1995 : différents mécanismes de diffusion latérale. Diffusion gênée (A) par des agrégats de molécules ou (B) par le cytosquelette. (C) Diffusion dirigée le long d'un microtubule de cytosquelette. (D) Diffusion libre

Dans les décennies suivantes, de nombreux travaux montrent que la plupart des protéines membranaires ne diffusent pas aussi librement que ne le suppose le modèle de Singer et Nicolson. Quelques mécanismes de diffusion sont recensés par Jacobson en 1995 dans [Jacobson 95]. Jacobson insiste particulièrement sur le rôle du cytosquelette dans le confinement des protéines, s'appuyant pour cela sur les travaux de Kusumi (ces travaux seront exposés dans la section 1.3.1). En parallèle, des travaux ont continué à porter sur les hétérogénéités de composition moléculaire dans la membrane, donnant lieu au modèle des *radeaux lipidiques* de Simons (modèle développé dans la section 1.4).

1.2 Les constituants de la membrane plasmique

La détermination de la composition chimique des membranes cellulaires nécessite un certain nombre d'étapes : séparation des tissus, homogénéisation, centrifugation, extraction et analyse (par chromatographie, diffraction X...).

Les membranes sont constituées par un assemblage de lipides, de protéines et de composés osidiques.

1.2.1 Les lipides membranaires

Les lipides de la membrane cellulaire sont tous des amphiphiles possédant des groupements aliphatiques ou aromatiques (comme le cholestérol) et des groupements

polaires variés. La géométrie de chaque chaîne aliphatique dépend de l'existence ou non d'insaturations. Les chaînes d'acides gras non saturées sont très flexibles et possèdent un très grand nombre de conformations possibles, chaque liaison possédant 3 degrés de liberté de rotation. La conformation la plus probable est celle de l'extension maximale de la chaîne, conduisant à une énergie minimale. Une chaîne insaturée possède au moins une double liaison. La configuration *cis*, largement plus probable que la configuration *trans*, conduit à un coude dans la chaîne carbonée de l'ordre de 30°.

La tête polaire est attachée aux deux chaînes carbonées par l'intermédiaire d'une molécule servant de lien entre les trois groupements. Ce lien, qui joue le rôle de squelette pour l'ensemble de la molécule, est généralement réalisé par un alcool, comme le glycérol, ou une sphingosine. Les groupements polaires sont le plus souvent basés sur un groupe phospho ou glyco, d'autres molécules venant s'y greffer.

Les trois grandes familles de lipides membranaires

Les lipides sont classés en fonction de la nature de leur molécule de liaison et de celle de leurs chaînes carbonées : on distingue donc les glycérophospholipides, les glycéroglycolipides, les sphingophospholipides et les sphingoglycolipides.

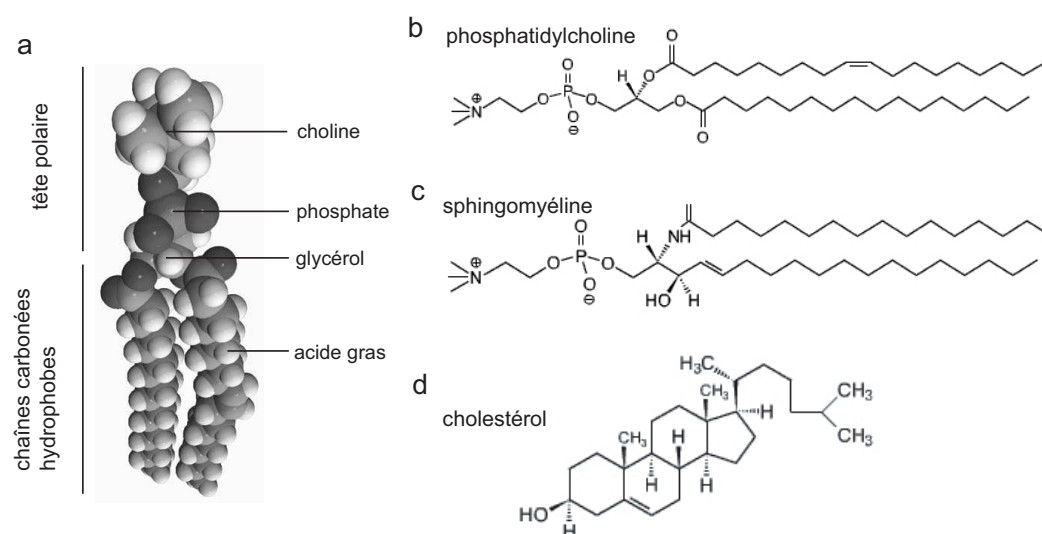


FIG. 1.6 – a) Structure des phospholipides. b), c), d) Les trois catégories de phospholipides. la phosphocholine est un glycérolipide, la sphingomyéline est un sphingolipide, et le cholestérol est un stérol. Chaque lipide est représenté sous forme compacte (chaque sphère a pour rayon le rayon de Van der Waals de l'atome) et par sa formule semi-développée. D'après le catalogue Avanti.

Les glycérolipides Les glycérolipides sont bâtis sur la structure du glycérol. Deux de ses trois fonctions alcool, dont la fonction secondaire, sont estérifiées par des

acides gras à longue chaîne (principalement 16 et 18 carbones). Une des deux chaînes d'acides gras est généralement insaturée.

Si la troisième fonction alcool est substituée par un éther de mono- ou digalactoside, le lipide est un glycéroglycolipide.

Si la troisième fonction alcool est estérifiée par un acide phosphorique, le lipide est un glycérophospholipide. L'acide phosphorique peut lui-même être estérifié par différents groupements, tels que la choline, la sérine, l'éthanolamine. Quelques-uns des lipides ainsi formés sont recensés dans le tableau 1.1 tiré de [Lasic 93] et dessinés dans la figure 1.7.

TAB. 1.1 – Principaux glycérophospholipides présents dans la membrane.

Groupe ayant estérifié l'acide phosphorique	Nom du lipide	Abr.	Charge
–H	acide phosphatidique	PA	négative
–CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	phosphatidylcholine	PC	zwitterion
–CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	phosphatidyléthanolamine	PE	zwitterion
–CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO [–]	phosphatidylsérine	PS	négative
–CH ₂ CHOHCH ₂ OH	phosphatidylglycérol	PG	négative
–HC ₆ H ₅ (OH) ₅	phosphatidylinositol	PI	négative
–CH ₂ CHOHCH ₂	cardiolipine	CL	négative

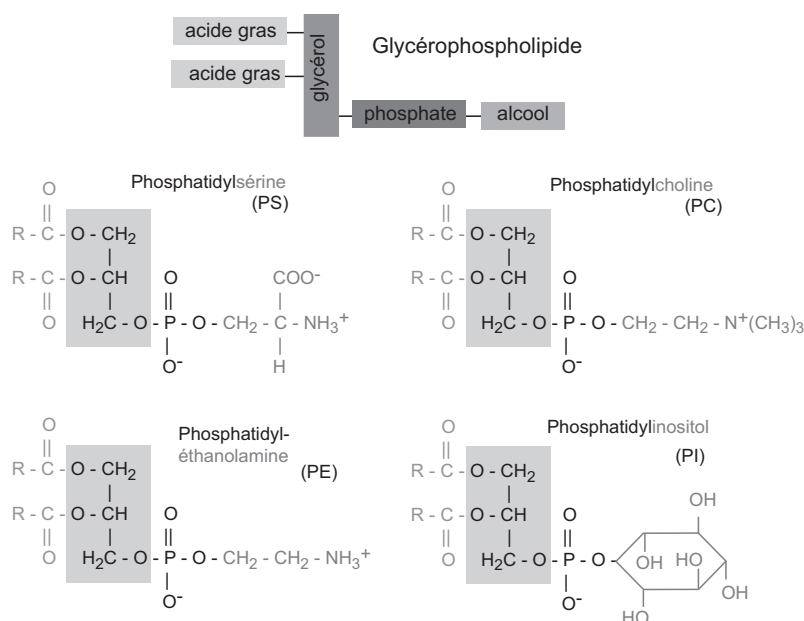


FIG. 1.7 – Exemples de glycérophospholipides.

Les sphingolipides Les sphingolipides sont des dérivés de céramides, contenant à la fois des donneurs et des accepteurs de liaisons hydrogène. Contrairement aux glycérophospholipides, les deux chaînes carbonées sont souvent saturées.

Si le groupement polaire est la phosphorylcholine, le lipide obtenu est la sphingomyéline, un sphingophospholipide. Le groupe polaire de la sphingomyéline est donc identique à celui de la phosphatidylcholine.

Parmi les sphingolipides, on peut également compter les gangliosides. Ce sont des sphingoglycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acides sialiques. La nomenclature des gangliosides comporte deux lettres et un chiffre. Par exemple, dans le ganglioside G_{M1} , le G signifie ganglioside, le M correspond au nombre de résidus d'acide sialique dans l'oligosaccharide ($M \equiv 1$) et le chiffre est lié au nombre de résidus d'oses dans la chaîne à l'exception des acides sialiques. G_{M1} est ainsi un monoacide sialique comportant 4 résidus d'oses en sus du résidu d'acide sialique.

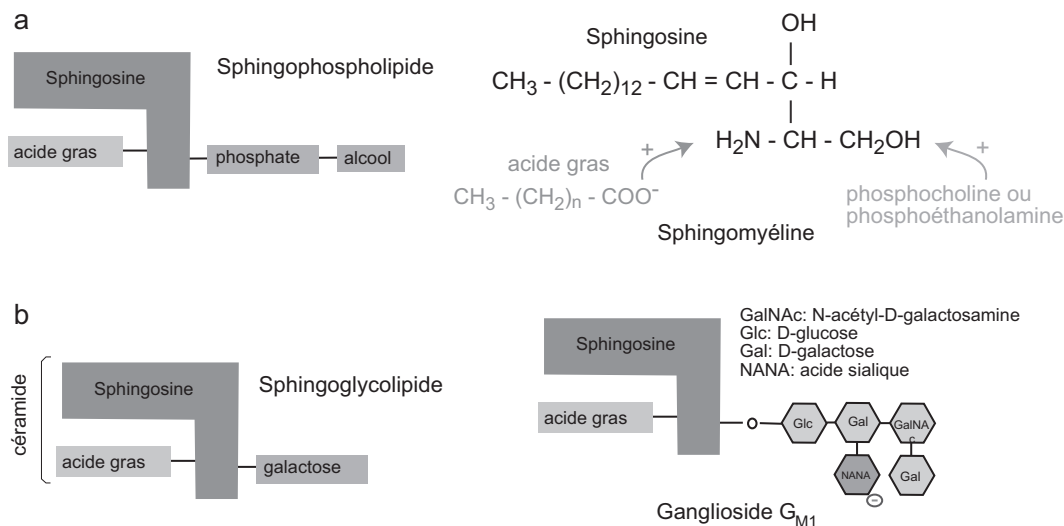


FIG. 1.8 – Exemples de sphingolipides.

La structure de base des sphingolipides est un amino-alcool à longue chaîne, la sphingosine. Un acide gras amidifie la fonction amine, tandis que la fonction alcool secondaire porte le groupement polaire. Suivant la nature de ce groupement polaire, on peut distinguer les sphingophospholipides (groupement polaire phosphorylé) et les sphingoglycolipides (groupement polaire glycosylé). a) structure des sphingophospholipides et exemple de la sphingomyéline. b) structure des sphingoglycolipides et exemple du ganglioside G_{M1} .

Les stérols Les stérols sont des molécules composées de 3 cycles à 6 carbones et 1 cycle à 5 carbones. Ces quatre cycles forment une structure plane et rigide, sur laquelle différents groupements peuvent être attachés. Les molécules de stérol ne peuvent former une bicouche à elles seuls, mais peuvent s'insérer dans la membrane avec la même orientation que les phospholipides. Le cholestérol interagit préférentiellement avec les sphingolipides plutôt qu'avec les phospholipides insaturés

[Ramstedt 02]. La figure 1.9 montre l'insertion des molécules de cholestérol entre les chaînes des phospholipides.

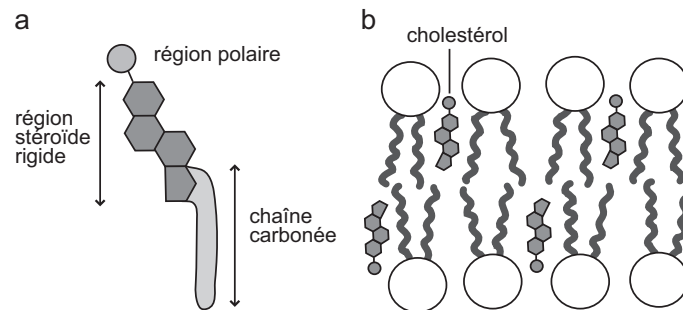


FIG. 1.9 – a) Structure du cholestérol. b) Insertion dans la membrane.

Variété de la composition lipidique des membranes

On observe de grandes variations dans la composition des membranes de différentes cellules ou des membranes de différentes organelles d'une même cellule. La membrane d'une mitochondrie a notamment une composition lipidique assez spécifique.

La composition respective des deux feuillets de la membrane d'une cellule est également différente. Les lipides chargés sont ainsi très présents dans le feuillet interne, tandis que les lipides PC et SM se trouvent surtout dans le feuillet externe. La perte d'asymétrie et notamment la présence de lipides PS sur le feuillet externe est un signal de mort cellulaire. La composition lipidique de la membrane des globules rouges humains est détaillée dans la figure 1.10.

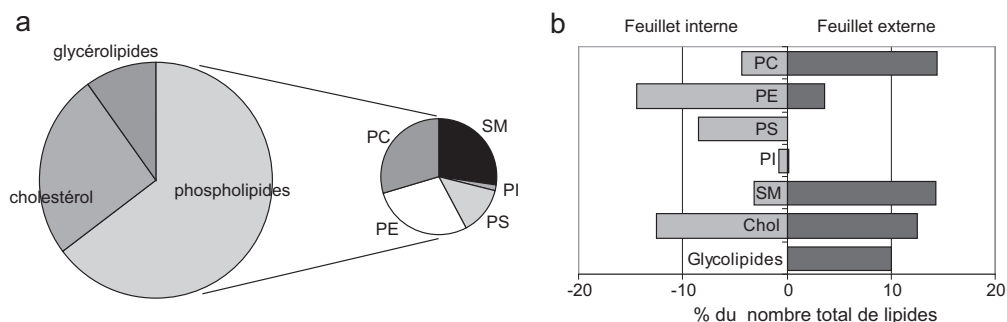


FIG. 1.10 – Composition lipidique de la membrane du globule rouge humain.

a) Proportions relatives des différents lipides de la membrane du globule rouge humain. D'après [Tanford 80]. b) Composition lipidique des deux feuillets de la membrane du globule rouge humain.

Propriétés physiques des membranes lipidiques

La plupart des lipides peuvent prendre des structures différentes selon leur état physicochimique et les conditions physiques extérieures. La structure en bicouche lipidique est fréquemment rencontrée. Deux paramètres d'ordre peuvent alors être étudiés : la surface moyenne occupée par molécule et la forme de la chaîne carbonée.

La surface moyenne par lipide est quasiment indépendante de la longueur de la chaîne carbonée. Dans les phases ordonnées, elle est également relativement indépendante de la température : elle est de l'ordre de 0.4 à 0.6 nm^2 . L'épaisseur d'une bicouche dans les phases ordonnées est fonction du diamètre des têtes polaires de lipides, de l'inclinaison des chaînes carbonées et de l'épaisseur de l'interface entre les deux monocouches.

L'inclinaison des chaînes carbonées est due à des contraintes de compactage des têtes polaires ; elle disparaît dans les phases désordonnées. La surface moyenne par lipide devient néanmoins plus grande ($\geq 0.75 \text{ nm}^2$), les chaînes carbonées se plaçant les unes par rapport aux autres de façon plus désordonnée. Les chaînes étant agencées de façon moins compacte, l'épaisseur de la bicouche est réduite de 30 à 50% par rapport aux bicouches en phase ordonnée. Cette réduction n'est qu'en partie compensée par l'hydratation supérieure des têtes polaires et par l'augmentation des fluctuations perpendiculairement au plan de la bicouche. Les bicouches fluides sont donc moins épaisses que les mêmes bicouches en phase ordonnée (cf. figure 1.11b).

Le deuxième paramètre d'ordre possible pour distinguer les différentes phases des bicouches lipidiques est l'ordre de la chaîne carbonée. On distingue généralement les phases suivantes : la phase cristalline, la phase ordonnée (ou phase gel), la phase désordonnée (ou phase fluide ou cristal liquide). Il est néanmoins possible d'affiner une telle distinction en ajoutant d'autres paramètres d'ordre tels que les ordres d'orientation et de rotation des chaînes carbonées et/ou des têtes polaires. Dans les paragraphes suivants, nous étudions les effets de la température sur la morphologie des bicouches lipidiques en fonction de ces paramètres.

La phase cristalline et la *sous-transition* À basse température, les lipides hydratés forment des structures cristallines denses. Dans la phase cristal, les chaînes carbonées peuvent être inclinées (phase L_c') ou non (phase L_c). Lorsque la température croît, cet état devient instable, l'agitation thermique provoquant en premier lieu des mouvements de rotation des chaînes carbonées. À la température de sous-transition T_s , il y a transition de phase d'un cristal à deux dimensions en une phase gel moins compacte. L'obtention d'une structure cristalline lamellaire est favorisée par une température basse, de longues chaînes carbonées sans insaturation (i.e. sans double liaison), mais aussi un fort compactage des lipides et une faible hydratation des têtes polaires.

La phase gel et la *prétransition* Dans la phase gel, les chaînes carbonées des lipides ont toutes la même orientation. Si elles sont inclinées, comme c'est le cas le plus souvent, la phase gel est notée $L_{\beta'}$ et s_o si elles ne le sont pas. Presque toutes

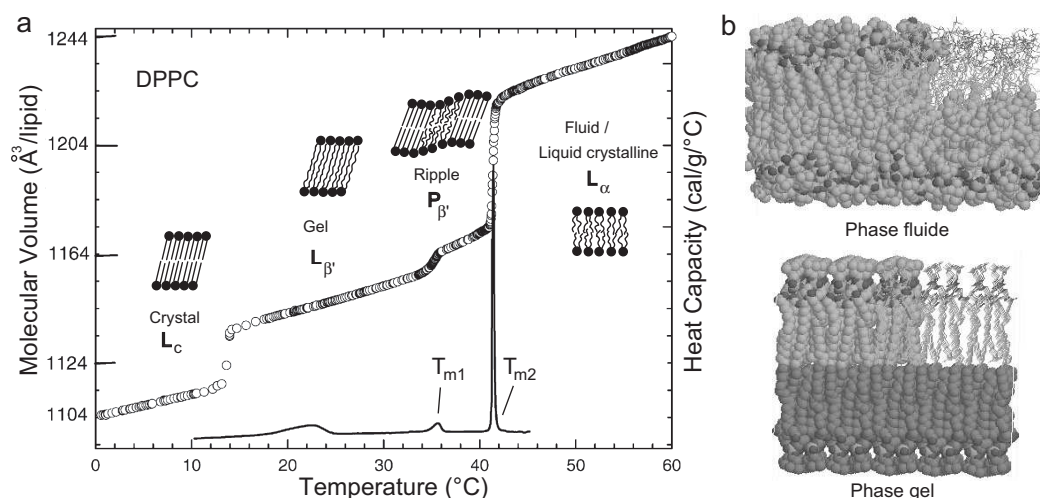


FIG. 1.11 – Transitions de phase de la phosphatidylcholine.

a) Surface par tête lipidique (cercles) et capacité calorifique (ligne continue) en fonction de la température pour des bicouches de DPPC dans l'eau en excès [Nagle 82], [Tristram-Nagle 87]. b) Simulation de dynamique moléculaire pour une bicouche de phosphatidylcholine [Heller 93]. Visualisation en mode compact : pour un même nombre de lipides, la bicouche en phase fluide est plus fine et plus étendue latéralement que la bicouche en phase ordonnée.

les doubles liaisons sont en configuration *trans*, donnant aux chaînes carbonées leur extension maximale. Lorsque la température augmente encore, les chaînes carbonées de lipides dans les phases s_o ou $L_{\beta'}$ oscillent de plus en plus rapidement. La mobilité rotationnelle de la tête polaire des phospholipides (notamment autour de la liaison P–O du glycérol) et la surface moyenne par lipide augmentent notablement à la température de prétransition T_p . L'augmentation de la surface moyenne occupée dans le plan de la membrane par les chaînes carbonées est néanmoins beaucoup plus faible. Il est probable que, lors de la prétransition, les chaînes carbonées glissent les unes le long des autres, tout en restant en contact étroit (figure 1.11a). Ceci pourrait expliquer les images obtenues en microscopie électronique qui montrent des ondulations régulières de la surface de la bicouche. On n'observe la prétransition lipidique que lorsque les têtes polaires des lipides sont suffisamment hydratées et que leurs chaînes carbonées sont complètement saturées. On peut imaginer en effet que les insaturations, créant des coudes dans les chaînes, ne leur permettent pas de glisser les unes par rapport aux autres.

La phase fluide et la transition de phase principale Contrairement aux phases cristal et gel, les chaînes carbonées des lipides en phase fluide sont désordonnées, une plus haute température permettant le passage aisé d'une conformation à une autre. Les mouvements des lipides au sein de la bicouche en phase fluide sont représentés dans la figure 1.12. Cette phase fluide est également appelée phase

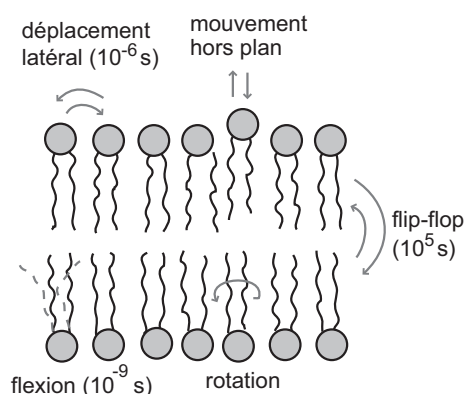


FIG. 1.12 – Mouvements autorisés des lipides au sein d'une bicouche

liquide-cristallin (L_α) ou phase *liquide désordonné* (l_d). Alors que, dans la phase gel, les doubles liaisons des chaînes carbonées sont toutes dans la configuration *trans*, certaines doubles liaisons sont dans la configuration *cis* dans la phase *liquide ordonné*. On peut remarquer que l'ordre des chaînes carbonées décroît le long de la normale à la bicouche en direction de l'interface entre les deux feuillet.

Le passage de la phase gel à la phase fluide est une transition du premier ordre (transition qui implique un changement de capacité calorifique et une chaleur latente, alors qu'à une transition du second ordre ne correspond pas de chaleur latente). Cette transition s'effectue à la température de fusion T_m des lipides. Cette température dépend de la longueur des chaînes carbonées ainsi que de leur degré d'insaturation. L'état s_o est favorisé par des chaînes d'acides gras saturées (la température T_m étant alors plus élevée), alors que l'état l_d est favorisé par l'existence d'une ou plusieurs doubles liaisons dans la chaîne carbonée (T_m est alors plus basse).

1.2.2 Les protéines membranaires

Les protéines membranaires sont associées à la membrane de différentes façons, représentées sur la figure 1.13.

Nombre de protéines sont transmembranaires et traversent de part en part la bicouche lipidique (exemples 1, 2 et 3 de la figure 1.13a). Ces protéines sont amphiphiles : leur partie hydrophobe interagit avec les chaînes carbonées des lipides membranaires tandis que leurs parties hydrophiles sont exposées à l'eau, de chaque côté de la bicouche. Ces protéines ne sont solubilisées que par des détergents ou des solvants organiques, capables de concurrencer les interactions entre chaînes carbonées.

Certaines autres protéines peuvent se trouver intégralement dans le cytosol et sont alors associées au feuillet interne de la membrane, soit par une hélice α amphiphile (exemple 4 de la figure 1.13a), soit par une ou plusieurs chaînes lipidiques qui peuvent être des chaînes d'acides gras ou des groupements prenyl (exemple 5 de la figure 1.13a).

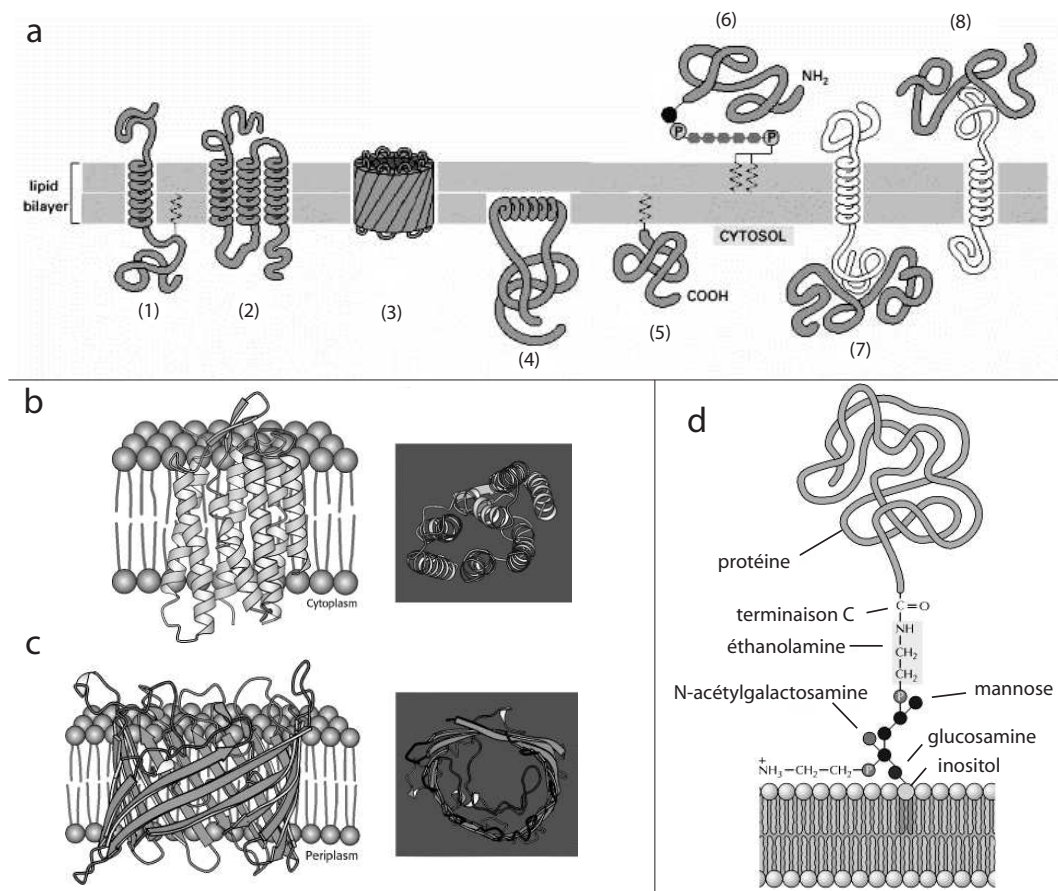


FIG. 1.13 – Les protéines membranaires.

a) Modes d'ancrage des protéines à la membrane [Alberts 02]. La plupart des protéines traversent la bicouche sous forme (1) d'une hélice α , (2) de plusieurs hélices α ou (3) d'un feuillet β enroulé. Certaines de ces protéines peuvent également être liées de façon covalente à une chaîne d'acides gras insérée dans le feuillet interne (1). D'autres protéines ne sont exposées qu'à une seule face de la membrane par (4) une hélice α amphiphile, (5) une chaîne lipidique ou (6) une ancre GPI. Enfin, des protéines sont liées par des liaisons non-covalentes à d'autres protéines membranaires (7,8). b) Structure de la bactériorhodopsine, formée de sept hélices α traversant la membrane. Vue à travers la bicouche et vue depuis la face cytoplasmique. c) Structure de la porine bactérienne (provenant de *Rhodospseudomonas blastica*), formée entièrement de feuillets β . Vue de côté et vue depuis la face périplasmique. Un seul monomère de la protéine trimérique est représenté. D'après [Berg 02]. d) Protéine ancrée par un glycosylphosphatidylinositol (GPI). D'après [Cooper 00].

D'autres protéines peuvent encore être entièrement exposées à la surface externe des cellules et attachées à la membrane par une ancre. Elles sont dans ce cas attachées à la bicouche lipidique par une liaison covalente (par l'intermédiaire d'un oligosaccharide spécifique) avec un phosphatidylinositol placé dans le feuillet externe (exemple 6 de la figure 1.13) : ce sont les protéines ancrées GPI. Les protéines ancrées GPI sont synthétisées comme des protéines transmembranaires dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG). Alors qu'elles sont encore dans le REG, la partie des

protéines localisée dans la lumière est clivée sous l'action d'une protéase, détachant ainsi la protéine de sa partie transmembranaire ; une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) est alors ajoutée. La protéine peut être détachée de son ancre après utilisation d'une enzyme : la phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol.

Enfin, de nombreuses protéines n'ont pas de partie hydrophobe et sont intégralement situées dans le cytoplasme ou à l'extérieur de la cellule. Elles sont attachées par des liaisons électrostatiques ou des liaisons hydrogène à d'autres protéines membranaires (exemples 7 et 8 de la figure 1.13). Ces protéines sont solubilisées par extraction par des solutions fortement salines (comme une solution de NaCl à 1M), ou de fort pH.

Le mode d'attachement de la protéine avec la bicouche lipidique est lié à la fonction de la protéine. Seule une protéine transmembranaire peut transporter des molécules à travers la membrane. C'est le cas de l'aquaporine, qui permet le passage des molécules d'eau. Les récepteurs de surface sont également des protéines transmembranaires, qui se lient avec les molécules de signal à l'extérieur de la cellule et génèrent des signaux intracellulaires de l'autre côté de la bicouche. Les protéines qui se trouvent entièrement d'un côté ou de l'autre de la membrane ne peuvent avoir qu'une fonction impliquant un seul des deux espaces intra ou extracellulaire, à moins qu'il n'existe une interaction avec un composant de l'autre feuillet. Certaines protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire sont par exemple liées au feuillet interne de la membrane par une ou plusieurs liaisons covalentes avec des lipides du feuillet interne.

La compartimentalisation semble indispensable à l'activité biologique car elle favorise la mise en présence des différents acteurs d'une réaction. Deux modèles de compartimentalisation de la membrane biologique sont généralement proposés : les microfilaments d'actine constitutifs du cytosquelette ainsi que la présence de microdomaines lipidiques sont susceptibles d'entraver la libre diffusion des molécules membranaires.

1.3 Le cytosquelette

1.3.1 Les différents types de cytosquelette

Le cytosquelette est un réseau de filaments protéiques présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et procaryotes. Il intervient notamment dans la morphologie et la motilité cellulaire ainsi que dans les mouvements intracellulaires (moteurs moléculaires). Trois grandes catégories de filaments constituent le cytosquelette : les microfilaments d'actine (ou F-actine), les filaments intermédiaires et les microtubules (figure 1.14). Chacun de ces types de filaments est constitué de protéines monomériques qui se lient avec de l'adénosine triphosphate (ATP) ou de l'adénosine diphosphate (ADP). La molécule d'ATP est hydrolysée en ADP après polymérisation. Nous n'étudierons ici que les microfilaments d'actine.

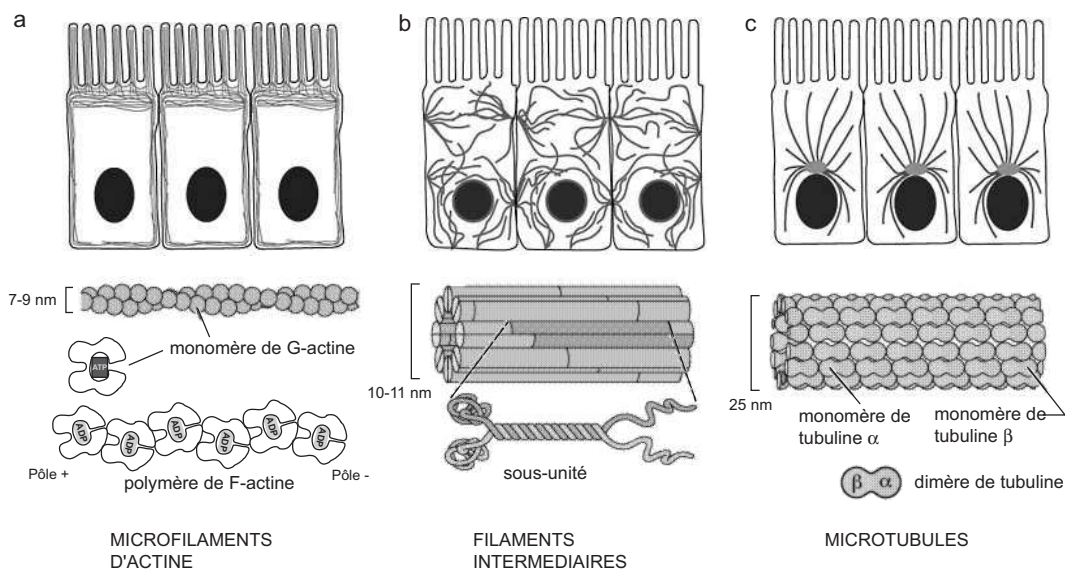


FIG. 1.14 – Représentation schématique de l'architecture du cytosquelette de cellules épithéliales.

a) Les microfilaments d'actine ont des polymères hélicoïdaux. Ce sont des structures flexibles organisées en réseaux bi et tridimensionnels. b) Les filaments intermédiaires s'étendent à travers le cytoplasme, apportant aux cellules leur résistance mécanique. c) Les microtubules rayonnent à partir du centre organisateur appelé le centrosome. (D'après [Alberts 02])

Les microfilaments d'actine

La concentration cellulaire en monomères d'actine est comprise entre 2 et 8 mg/mL, soit entre 50 et 200 μM . Dans les cellules fibroblastiques par exemple, environ la moitié de l'actine est à l'état polymérisé dans les microfilaments (ou actine-F, pour *filamenteuse*) et l'autre moitié est sous forme de monomères (ou actine-G, pour *globulaire*, de masse moléculaire 41 kDa).

La polymérisation d'actine *in vitro* La polymérisation d'actine s'effectue *in vitro* en trois étapes séquentielles. La première étape est la nucléation : les monomères d'actine-G s'agrègent en oligomères courts et instables. Dès qu'un oligomère atteint une certaine longueur (de l'ordre de trois à quatre sous-unités), il peut jouer le rôle de noyau de nucléation, qui s'allonge lors de la seconde étape par addition de monomères à chacune de ses extrémités. Lorsque les filaments d'actine-F croissent, la concentration en monomères d'actine-G diminue jusqu'à un équilibre. Cet équilibre dynamique constitue la troisième phase : les échanges entre actine-G et actine-F ne conduisent plus à un changement de masse de l'actine-F totale. La concentration d'actine-G à l'état d'équilibre est appelée *concentration critique*. Typiquement, la concentration critique de l'actine-G *in vitro* est de 0.1 mM. Au-dessus de cette valeur, une solution d'actine-G polymérise ; en-dessous, une solution d'actine-F dépolymérise.

La polymérisation d'actine *in vivo* s'effectue selon le même schéma ; des protéines régulatrices associées aux fibres d'actine sont alors présentes et peuvent modifier l'équilibre dynamique entre actine-F et actine-G (voir plus loin la figure 1.16).

La polymérisation d'actine dans la cellule Les monomères d'actine-G peuvent s'associer en présence d'ATP en actine-F qui s'organise en une structure flexible de la forme d'une hélice serrée de 5 à 9 nm de diamètre. Deux hélices d'actine-F s'enroulent l'une autour de l'autre (figure 1.14) pour former les filaments d'actine. Au cours de la formation des filaments, la concentration des monomères libres chute jusqu'à atteindre la concentration critique pour laquelle les monomères et les filaments sont à l'équilibre. Les microfilaments sont néanmoins polaires : les deux extrémités possèdent des caractéristiques cinétiques différentes. Les monomères d'actine s'assemblent plus rapidement à l'extrémité + ou barbée qu'à l'extrémité – ou pointue. La concentration critique de l'extrémité – est plus élevée que celle de l'extrémité +. À l'équilibre entre l'actine-G et l'actine-F, la concentration d'actine-G est intermédiaire entre ces deux concentrations critiques. Il y a alors une perte nette de molécules à l'extrémité – et une addition nette de molécules à l'extrémité +, dans un mouvement de tapis roulant. Lors de la réaction de polymérisation, l'ATP est hydrolysé en ADP, qui reste piégé dans le polymère. Les molécules d'actine liées à l'ADP sont enlevées à l'extrémité –. Ce processus est catalysé par la cofiline qui se lie à l'actine-ADP et la détache du filament. Les monomères d'actine doivent être rechargés en ATP avant de rejoindre l'extrémité + du filament. La profiline accélère l'échange d'ADP pour l'ATP (figure 1.16a).

Il existe deux types d'assemblage des filaments d'actine :

- Les câbles de tension, ou fibres de stress, sont des faisceaux parallèles serrés : orientés avec la même polarité, les filaments sont espacés régulièrement grâce à une liaison avec la fimbrine. Ces fibres traversent la cellule et la rigidifient (figure 1.15a,c).
- Les réseaux d'actine sous-corticale, ou *cytocortex*, animent la membrane plasmique. Ces réseaux forment des mailles : les filaments sont organisés en un arrangement lâche, avec beaucoup d'interconnexions orthogonales formées par la filamine (figure 1.15b,d). Au niveau du cytocortex, les filaments d'actine peuvent en outre former des protrusions en longs faisceaux, soit perpendiculaires à la membrane, les filopodes, soit en feuillets membranaires, les lamelles. Ces deux formes d'organisation sont dynamiques et leur activité est contrôlée non seulement par la concentration en calcium, mais aussi par un grand nombre de protéines régulatrices.

Effet des drogues sur les filaments d'actine

Certaines drogues permettent de modifier les filaments d'actine en inhibant de façon spécifique soit sa polymérisation comme les cytochalasines et les latrunculines, soit sa dépolymérisation comme la phalloïdine (figure 1.17).

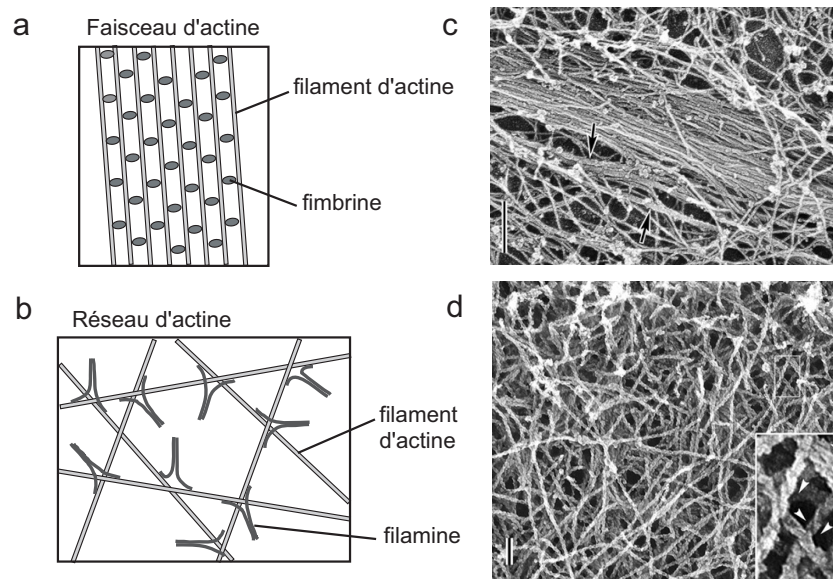


FIG. 1.15 – Agencement des filaments d'actine.

a) Les fibres d'actine sont formées de nombreux filaments parallèles entre eux et reliés par des protéines de alpha-actinine. b) Le réseau d'actine est formé d'un arrangement lâche de filaments d'actine stabilisé par des protéines telles que la filamine (ou la spectrine dans les globules rouges). c) Image obtenue par microscopie électronique d'une fibre de stress dans un fibroblaste REF-52 en culture. Les microtubules adjacents sont indiqués par des flèches. La barre représente 0.2 μm . d) Image obtenue par microscopie électronique d'un réseau d'actine dans un lamellipode de fibroblaste REF-52 en culture. Un agrandissement de la boîte est inséré. La polarité des filaments est indiquée par des flèches. La barre représente 0.2 μm . c) et d) d'après [Svitkina 97].

Les cytochalasines bloquent la polymérisation de l'actine en se fixant à l'extrémité en croissance rapide des microfilaments (extrémité +), ce qui prévient l'ajout de nouveaux monomères d'actine-G [Yahara 82]. De plus, certaines cytochalasines peuvent provoquer la coupure des microfilaments [Urbanik 89]. Ces deux propriétés rapprochent les cytochalasines des gelsolines. La latrunculine séquestre l'actine-G, comme le fait la β 4-thymosine [Coue 87, Weber 92, Spector 99]. La phalloïdine se fixe le long des microfilaments d'actine en formant un complexe stable avec l'actine-ADP/Pi, ce qui inhibe la libération du phosphate, prévient la dissociation de l'actine G à l'extrémité – et stabilise ainsi les microfilaments en inhibant leur dépolymérisation. Dans des cellules fixées et perméabilisées, on peut aussi utiliser la phalloïdine couplée à un fluorochrome pour mettre en évidence l'actine-F par la microscopie à fluorescence.

Les cytochalasines Les cytochalasines (du grec cytos, cellule, et chalasis, relaxation) sont un groupe de métabolites fongiques. Découvertes en 1964, ces toxines sont toutes basées sur une même structure chimique : elles possèdent un cycle isoindole auquel est attaché un macrocycle de 11 à 14 atomes.

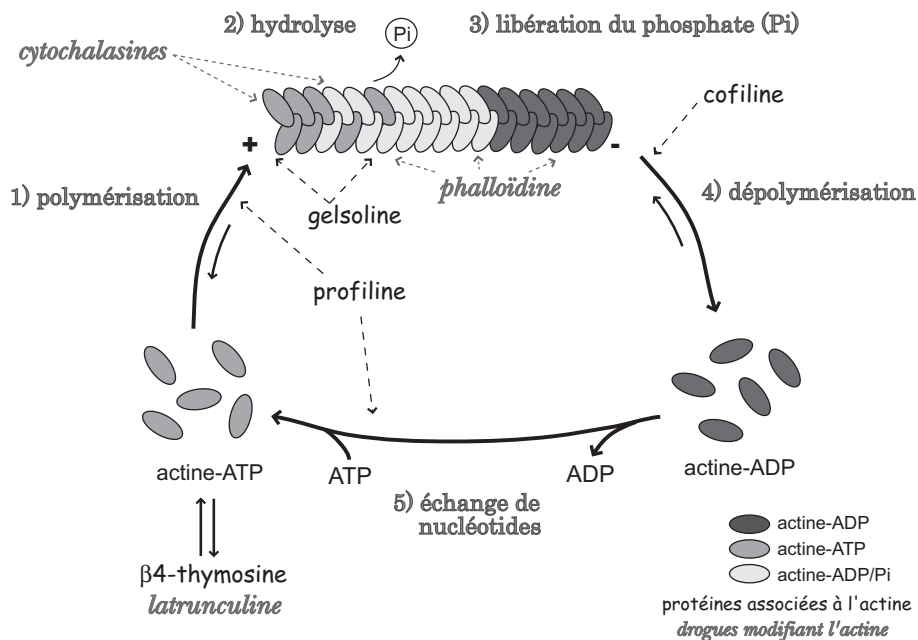


FIG. 1.16 – Mécanismes de polymérisation de l'actine.

Cette figure distingue les trois états de l'actine : l'actine-ATP, le complexe actine-ADP/Pi et l'actine-ADP. Par convention, on désigne comme extrémité + l'extrémité des microfilaments à croissance rapide et l'extrémité - celle qui tend à perdre ses monomères. Les monomères d'actine sont donc continuellement ajoutés à l'extrémité + et relargués à l'extrémité -, comme dans un tapis roulant. Dans les microfilaments, l'ATP est hydrolysé en ADP et phosphate Pi. C'est la dissociation du Pi qui permet aux monomères d'actine-ADP de se détacher de l'extrémité -. Les monomères d'actine-ADP doivent être reconditionnés en actine-ATP avant de pouvoir se fixer à l'extrémité + du microfilament. Plusieurs protéines régulent le cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. La profiline accélère l'addition à l'extrémité + des monomères d'actine-ATP non séquestrés par la β4-thymosine. La gelsoline coupe les microfilaments d'actine et coiffe l'extrémité + du fragment distal qu'elle produit. La dissociation à l'extrémité - est catalysée par la cofiline, qui se lie à l'actine-ADP et la décroche du microfilament. La profiline accélère également l'échange d'ADP pour l'ATP au niveau des monomères d'actine. Ceux-ci peuvent être réversiblement séquestrés par la β4-thymosine, qui inhibe donc la polymérisation. Le cycle de polymérisation/dépolymérisation peut aussi être inhibé par trois types de poisons. Les cytochalasines coiffent l'extrémité + des microfilaments, ce qui empêche l'ajout de monomères, tandis que la phalloïdine se fixe le long des microfilaments, les stabilise et empêche ainsi leur dépolymérisation. La latrunculine séquestre l'actine-ATP comme le fait la β4-thymosine. (D'après [Amyere 01] et [Pollard 93])

La cytochalasine B est un alcaloïde fongique produit par le champignon *Drechslera dematiodidea*. Elle peut traverser la membrane cellulaire. La cytochalasine B réduit la longueur des filaments d'actine en bloquant l'addition (et le détachement) de monomères à l'extrémité + du polymère. Parallèlement, elle inhibe la division cellulaire, réduit la motilité cellulaire et provoque une fragmentation de l'ADN. Enfin, la cytochalasine B empêche le transport du glucose à travers la membrane cellulaire.

De la même façon, la cytochalasine D (figure 1.17a,f) est une toxine fongique

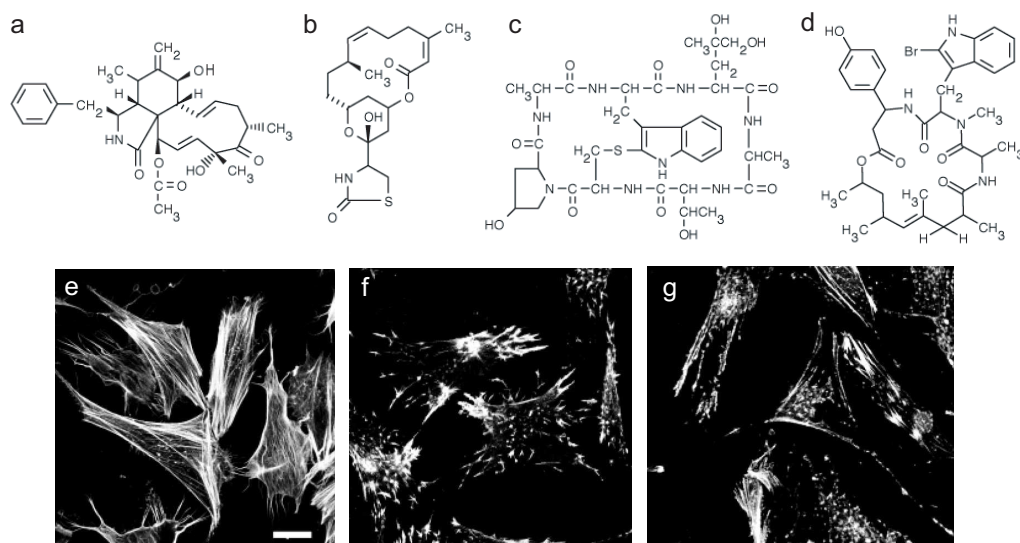


FIG. 1.17 – Drogues agissant sur les microfilaments d'actine.

a) Structure de la cytochalasine D. b) Structure de la latrunculine B. c) Structure de la phalloïdine. d) Structure de la jasplakinolide.

Images obtenues par microscopie confocale de fluorescence de cellules CEF dont le cytosquelette a été marqué par Rhodamine-phalloïdine après traitement ou non par une drogue du cytosquelette et fixation des cellules. e) Cellule sans traitement du cytosquelette. f) idem, avec traitement préalable par la cytochalasine D à $2 \mu\text{M}$ pendant 30 min. Presque tous les longs filaments ont été rompus et remplacés par des agrégats d'actine en différentes zones de la cellule (foyers). g) idem, avec traitement préalable par la latrunculine B 630 nm pendant 30 min. De nombreux petits agrégats d'actine-G coexistent avec l'actine-F corticale. La barre représente $50 \mu\text{m}$. e) f) et g) d'après [Wakatsuki 01].

(*Zygosporium mansonii*) qui empêche la polymérisation des filaments d'actine en se liant à l'extrémité + du polymère. Elle est environ dix fois plus efficace que la cytochalasine B. Elle active certaines voies de signalisation, causant l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, elle ne bloque pas le transport basal du glucose mais seulement celui qui est stimulé par insuline.

Les latrunculines Les latrunculines sont des toxines produites par certaines espèces d'éponges de la Mer Rouge (comme la *Latruncula magnifica*). La membrane cellulaire est perméable à ces drogues. En séquestrant les monomères d'actine-G, les latrunculines empêchent la polymérisation des filaments d'actine. Elles altèrent la forme des cellules et freinent l'endocytose. L'effet de la latrunculine B (figure 1.17b,g) est significativement plus faible que celui de la latrunculine A.

La phalloïdine Les phallotoxines sont un groupe de peptides bicycliques provenant de champignons vénéneux. La phalloïdine (figure 1.17c) est une toxine fongique provenant du champignon *Amanita phalloides*. La toxicité de la phalloïdine est attribuée à sa capacité à se lier à l'actine-F dans les cellules hépatiques et musculaires.

Il a été montré que la phalloïdine ne se lie qu'aux formes polymériques et oligomériques de l'actine et non aux monomères d'actine. Elle déplace donc l'équilibre entre les monomères et les filaments en faveur des filaments, abaissant la concentration critique de polymérisation d'un facteur 10 à 30 [Estes 81]. Les sous-unités d'actine se dissocient en effet plus difficilement des extrémités des filaments d'actine. Il faut noter que ce produit est fortement toxique et que la phalloïdine ne peut pas passer à travers la membrane cellulaire : elle ne peut donc pas être utilisée pour des expériences de stabilisation d'actine dans des cellules vivantes. Néanmoins, les conjugués fluorescents de la phalloïdine sont souvent utilisés pour marquer les filaments d'actine sur cellules fixées (figure 1.17e,f,g).

La jasplakinolide La jasplakinolide (figure 1.17d) est un peptide macrocyclique qui a été isolé à partir de l'éponge de mer *Jaspis johnstoni*. In vitro, il a été montré que la jasplakinolide stimule la nucléation des monomères d'actine et se lie avec l'actine-F ; cette drogue est donc susceptible d'augmenter la polymérisation de l'actine dans les cellules. De plus, contrairement aux autres stabilisateurs de l'actine-F tels que la phalloïdine, la jasplakinolide peut traverser la membrane cellulaire et peut donc être utilisée sur des cellules vivantes.

Le cytosquelette des globules rouges

Le cytosquelette du globule rouge est constitué de longs filaments de spectrine reliés entre eux par de l'actine. D'après les images obtenues en microscopie électronique, le réseau de spectrine est grossièrement triangulaire [Liu 87]. Chaque arête est constituée par un ou plusieurs filaments de spectrine ; chaque sommet correspond à un complexe de jonction.

La protéine structurant le cytosquelette du globule rouge est la spectrine, une protéine se liant à l'actine. La spectrine est un tétramère composé de deux chaînes polypeptidiques distinctes, les chaînes α et β . La chaîne β possède un domaine capable de se lier à l'actine à son extrémité N-terminale. Les chaînes α et β s'associent latéralement pour former des dimères, qui s'associent tête-bêche pour former des tétramères avec deux domaines se liant à l'actine séparés d'environ 200 nm (figure 1.18b). Les extrémités de ces tétramères s'associent à de courts filaments d'actine (14 sous-unités), formant ainsi le réseau de cytosquelette du globule rouge. Les complexes de jonction entre les différents tétramères de spectrine sont composés des filaments d'actine ainsi que de la tropomyosine, la tropomoduline (deux protéines empêchant l'actine de dépolymériser) et l'adducine. Plusieurs tétramères de spectrine pouvant s'attacher au même filament d'actine, le réseau formé est polygonal.

Le cytosquelette est attaché à la membrane plasmique par l'intermédiaire de deux protéines périphériques, elles-mêmes liées à une protéine transmembranaire spécifique. Ainsi, la protéine ankyrine se lie fortement à la fois à la spectrine et au domaine cytoplasmique de la protéine transmembranaire bande 3 (figure 1.18a). D'autre part, la protéine bande 4.1 se lie à la fois aux complexes de jonction spectrine-actine et au domaine cytoplasmique d'une autre protéine transmembranaire, la glycophorine

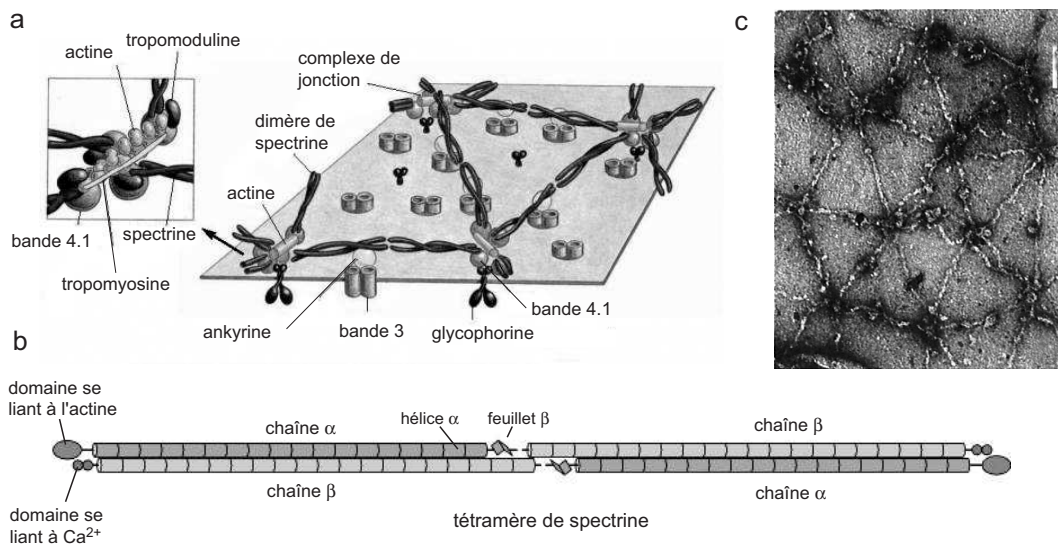


FIG. 1.18 – Cytosquelette des globules rouges vu du côté cytosolique.

a) Le cytosquelette sous-jacent à la membrane est constitué majoritairement de spectrine représentant environ 75% de la masse protéique ainsi que d'actine et de protéine de la bande 4.1. Le cytosquelette se présente comme un réseau à mailles majoritairement hexagonales dont les côtés sont constitués de spectrine et dont les noeuds sont composés de protéines de la bande 4.1 et d'actine. La spectrine, dimère composé d'une chaîne α et d'une chaîne β est présente dans la membrane du globule rouge sous forme de tétramères résultant de l'association de deux hétérodimères α/β (c). Chaque hétérodimère de spectrine fixe deux protéines de la bande 4.1, dont la présence favorise nettement la fixation de l'actine sur l'hétérodimère α/β . Le principal système d'ancrage du cytosquelette à la membrane est constitué par des interactions spectrine-ankyrine-bande 3. L'ankyrine se fixe sur la chaîne β de la spectrine avec une forte affinité à raison d'une molécule d'ankyrine pour une molécule de tétramère. La liaison entre l'ankyrine et la bande 3 s'effectue avec une affinité encore plus forte et une stoechiométrie de 1 : 1. Les nombreuses associations de la bande 4.1 avec les fragments cytosoliques des glycophorines et de la bande 3 stabilisent le cytosquelette à la membrane érythrocytaire. D'après [Alberts 02]. b) Structure du tétramère de spectrine, d'après [Cooper 00]. c) Image de microscopie électronique, d'après [Liu 87].

(figure 1.18a).

1.3.2 Impact de la présence des filaments d'actine sur la diffusion membranaire. Étude par Single Particle Tracking

La diffusion des constituants de la membrane plasmique a été étudiée par l'équipe de Kusumi par suivi de particule unique (en anglais, *Single Particle Tracking* ou SPT). De petites particules d'or colloïdal sont attachées aux protéines d'intérêt grâce à des ligands ou des anticorps contre ces protéines. Le suivi du mouvement d'une particule individuelle nécessite l'utilisation d'une caméra vidéo ayant une grande cadence de prise d'images, ainsi que l'utilisation d'algorithmes permettant, d'une part de localiser très précisément la particule (souvent avec une précision de l'ordre

de quelques dizaines de nanomètres), d'autre part de relier la position de la particule sur une image à la position correspondante sur l'image suivante.

L'analyse quantitative du mouvement des lipides est réalisée en calculant le déplacement carré moyen d'une particule pour différents intervalles de temps pour chaque trajectoire :

$$\text{MSD}(n\delta t) = \frac{1}{N-1-n} \sum_{j=1}^{N-1-n} [\vec{r}(j\delta t + n\delta t) - \vec{r}(j\delta t)]^2, \quad (1.1)$$

avec N le nombre total de pas et $n\delta t$ l'intervalle de temps pour lequel est calculé le déplacement carré moyen.

De telles analyses de diffusion ont été réalisées dans les globules rouges et dans différentes cellules eucaryotes.

SPT sur globules rouges : étude de la diffusion de la protéine bande 3

Le rôle du cytosquelette du globule rouge dans le ralentissement de la diffusion de la protéine bande 3 est suggéré dans de nombreux travaux de recherche : des mesures de FRAP ont notamment montré que le coefficient de diffusion de la protéine bande 3 est multiplié par un facteur 50 à 100 dans les globules rouges dépourvus de cytosquelette [Sheetz 80].

L'équipe de Kusumi a étudié la diffusion de la protéine transmembranaire bande 3 dans des *fantômes* de globules rouges (membranes de globules rouges vidées de leur hémoglobine), grâce à la technique de SPT. Lorsque les globules rouges subissent un traitement par la trypsine, la partie cytoplasmique de la bande 3 se clive. Une particule d'or de 40 nm de diamètre est attachée à la protéine bande 3 à l'aide d'un fragment Fab (*Fragment antigen binding*) anti-bande 3. La diffusion de la bande 3, liée à une bille d'or de 40 nm, est alors comparée dans des globules rouges respectivement traités par la trypsine et non traités.

Seules 20 à 30% des protéines bande 3 sont effectivement ancrées au réseau de spectrine par l'intermédiaire de l'ankyrine [Nigg 80].

Les études statistiques effectuées [Tomishige 98] permettent de déterminer le type de confinement rencontré. Elles ont montré que les trajectoires rapportées correspondent à un mouvement de diffusion brownienne limitée par des barrières franchissables : c'est le modèle de barrières du cytosquelette (*cytoskeleton fences model*). Dans le cas d'un confinement par un réseau, les modèles permettent de mesurer le coefficient de diffusion microscopique D_{micro} à l'intérieur d'une maille du réseau, le coefficient de diffusion macroscopique D_{macro} , la taille moyenne des mailles du réseau ainsi que la fréquence des sauts par dessus les barrières. La figure 1.19a résume les différentes trajectoires mesurées de bande 3. La protéine bande 3 intacte a un mouvement de diffusion de type *hop diffusion* quand elle est observée avec une résolution temporelle de 2 ms (trajectoire de gauche de la figure 1.19b). À cette même résolution temporelle de 2 ms, la protéine bande 3 clivée semble avoir un mouvement de diffusion brownienne libre (trajectoire centrale); au contraire, en améliorant la

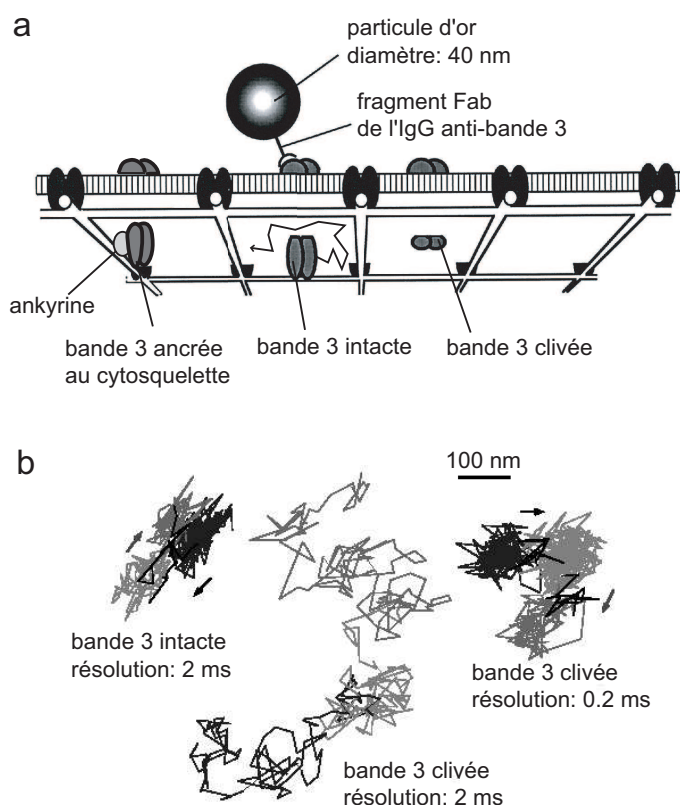


FIG. 1.19 – Expériences de SPT réalisées sur les globules rouges.

a) Le modèle expliquant la diffusion de la bande 3 dans les cellules trypsinisées et non traitées (membrane skeleton fence model). b) Trajectoires obtenues pour la bande 3 intacte et clivée à différentes résolutions temporelles. D'après [Tomishige 98]

résolution temporelle par un facteur 10, la bande 3 clivée semble également avoir un mouvement de *hop diffusion* (trajectoire de droite). La fréquence de saut de la bande 3 clivée étant plus grande que celle de la bande 3 intacte, il est nécessaire d'augmenter la résolution temporelle afin d'observer le mouvement de *hop diffusion*.

TAB. 1.2 – Paramètres obtenus par étude de la diffusion de la bande 3 dans la membrane des globules rouges, en utilisant le membrane fence skeleton model. D'après [Tomishige 98].

temp. (°C)	traitement	D_{micro} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	D_{macro} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	taille (nm)	aire (nm^2)	$t_{rés}$ (ms)	fréq. de saut (s^{-1})
37	contrôle	0,53	$6,6 \cdot 10^{-3}$	110	9 300	350	2.8
37	trypsine	0,59	$5,8 \cdot 10^{-2}$	130	14 000	60	16
26	contrôle	0,41	$4,6 \cdot 10^{-3}$	110	8 900	480	2.1

Les résultats sont résumés dans le tableau 1.2. Il a été montré que la taille moyenne du côté des mailles du réseau est identique dans le cas de la bande 3 intacte

que dans celui de la bande 3 clivée, c'est-à-dire de l'ordre de 110 nm. Les coefficients de diffusion microscopiques à l'intérieur de la maille sont également identiques ($D_{micro} = 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Seule la fréquence de saut entre mailles est différente : alors que la bande 3 passe une barrière en moyenne une fois toutes les 350 ms, la bande 3 clivée passe une barrière une fois toutes les 40 ms en moyenne.

Diffusion de la bande 3 étudiée par d'autres méthodes Les mouvements translationnels et rotationnels de la bande 3 ont été mesurés par d'autres méthodes, notamment le FRAP. L'étude par FRAP de la diffusion de Éosine-maléimide a ainsi conduit à la mesure d'un coefficient de diffusion de $D \approx 2,8 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ à 37°C [Klonis 02].

SPT sur cellules eucaryotes : étude de la diffusion de DOPE et du récepteur à la transferrine

Les premières mesures de SPT réalisées sur cellules eucaryotes ont été réalisées par Sheetz et ont déjà suggéré un rôle important pour le cytosquelette [Sheetz 89].

La mise en évidence de barrières à la diffusion de protéines a également été réalisée par des travaux de M. Edidin et M.P. Sheetz [Edidin 91a] grâce à des mesures avec des pinces optiques complétées par des mesures de FRAP à rayon variable (voir la section 1.4.3).

Le rôle du cytosquelette a ensuite été confirmé par les travaux de A. Kusumi. L'équipe de Kusumi étudie d'abord la diffusion dans des fibroblastes (cellules NRK, pour normal rat kidney fibroblasts) du phospholipide insaturé DOPE [Fujiwara 02]. Une particule d'or est attachée au DOPE à l'aide d'un fragment Fab. Les particules d'or ont un diamètre de 40 nm et sont visualisées avec un vidéomicroscope optique à grande vitesse d'acquisition : la précision de la localisation du centre des particules est respectivement de 17 nm et 6.9 nm à des résolutions temporelles de 25 μs et 2 ms. Il s'agit actuellement des meilleures résolutions temporelles atteintes par les différentes équipes travaillant sur le SPT.

La première étape consiste à vérifier que la présence de la particule d'or attachée ne modifie pas la diffusion du phospholipide seul. En particulier, plusieurs phospholipides peuvent être agrégés sur une même particule. L'attachement covalent du phospholipide avec un fluorophore évite ces éventuels problèmes d'agrégation. Les résultats de *Single Particle Tracking* sont alors comparés à ceux de suivi de fluorophore (SFVI, pour *Single Fluorophore Video Imaging*). Lorsque les phospholipides liés à un fluorophore ou à une bille ont le même comportement aux temps courts (<100 ms) et donc le même coefficient de diffusion microscopique (ce qui est le cas pour certains phospholipides), on peut supposer que l'utilisation de la particule d'or attachée par anticorps n'entraîne pas d'agrégation. L'utilisation d'une particule d'or est alors préférée : elle ne photoblanchit pas et permet un meilleur rapport signal/bruit, donc une meilleure résolution temporelle (la résolution temporelle de la SFVI est limitée à la milliseconde).

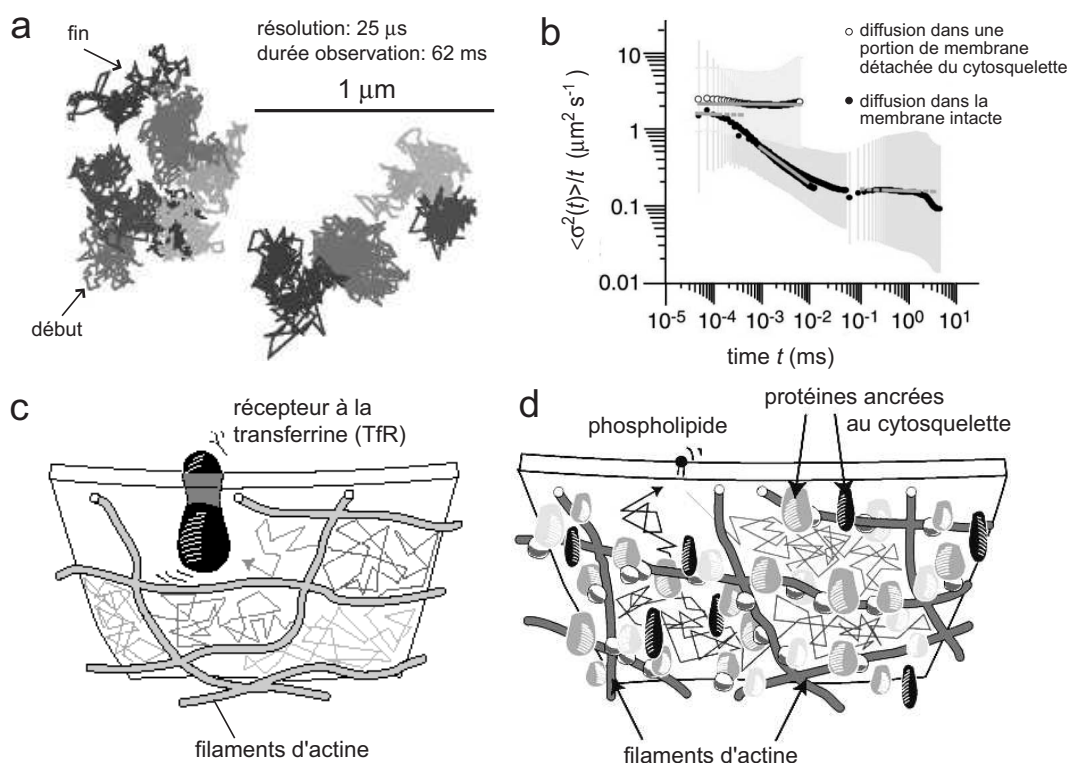


FIG. 1.20 – Expériences de SPT sur les cellules NRK.

a) Trajectoires de DOPE avec une résolution de 25 μs. b) Graphe logarithmique du déplacement carré moyen divisé par le temps en fonction du temps. Le déplacement carré moyen des trajectoires de DOPE dans une bulle de membrane (○) et dans la membrane intacte (●) a été obtenu en utilisant les données obtenues à des résolutions de 25 μs, 110 μs et 33 ms. La diffusion normale est caractérisée par une droite horizontale. c) modèle pour la diffusion du récepteur à la transferrine (membrane skeleton fence model). d) modèle pour la diffusion des phospholipides (skeleton anchored-protein picket model). D'après [Fujiwara 02]

Les phospholipides DOPE ont un mouvement de *hop diffusion*, caractérisé par une maille élémentaire de l'ordre de 230 nm. La maille est du même ordre de grandeur que celle mesurée avec le récepteur à la transferrine (tableau 1.3). Pourtant, DOPE est sur le feuillet interne : l'interaction avec le cytosquelette ne peut donc pas être directe comme pour le récepteur à la transferrine. Le mouvement de *hop diffusion* peut néanmoins être expliqué par un modèle de piquets (*anchored-protein picket model*). Nombre de protéines transmembranaires (jusqu'à 30%) sont en effet ancrées au cytosquelette et donc immobilisées. Elles constituent alors des obstacles à la diffusion des phospholipides [Ryan 88]. Elles jouent en effet le rôle de piquets ou de rangées de piquets alignés sur les filaments d'actine : les phospholipides subissent alors à la fois une gêne stérique et une friction de type hydrodynamique [Bussell 95], ainsi qu'un plus grand encombrement (*packing*). D'après des simulations de Monte-Carlo, une couverture du périmètre avec au moins 20% de protéines ancrées au cytosquelette suffit à obtenir un mouvement des phospholipides de type *hop diffusion*. Afin

de contrôler le rôle du cytosquelette, différentes expériences complémentaires ont été menées avec des drogues agissant sur le cytosquelette ; on peut noter par exemple que, lors d'un traitement par la jasplakinolide (drogue qui stabilise le cytosquelette), la taille de la maille reste inchangée tandis que le temps de confinement t_{conf} augmente. D'autre part, la diffusion de DOPE devient libre dans les bulles de membrane (*membrane blebs*) dans lesquelles le cytosquelette n'est plus en contact étroit avec la membrane (tableau 1.3).

TAB. 1.3 – Paramètres obtenus par étude de la diffusion de DOPE et du récepteur à la transferrine dans la membrane des cellules NRK, en utilisant le membrane fence skeleton model et le anchored protein-picket model. D'après [Fujiwara 02].

molécule (°C)	traitement	D_{micro} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	D_{macro} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	taille (nm)	$t_{rés}$ (ms)
DOPE	contrôle	5.4	0.99	230	11
DOPE	M β CD	7.1		280	13
DOPE	Latrunculine A			340	20
DOPE	Jasplakinolide			240	23
DOPE	bulle de membrane	8.8	7.4		
TfR	contrôle	5.2	0.31	260	55

1.4 Les radeaux lipidiques, ou *lipid rafts*

1.4.1 L'hypothèse des radeaux lipidiques

Alors que l'étude de la membrane cellulaire visait essentiellement à comprendre les mécanismes de transport des protéines nouvellement synthétisées vers leur emplacement fonctionnel, l'étude du rôle joué par les lipides dans le trafic intracellulaire a été remis au goût du jour notamment par la découverte de la participation de l'inositol triphosphate en tant que second messenger dans la transduction des signaux cellulaires [Berridge 87]). K. Simons et G. Van Meer étudient alors les mécanismes de génération et de maintien des différentes compositions lipidiques sur les membranes plasmiques polarisées de cellules épithéliales [Simons 88, Van Meer 88]. Le domaine basolatéral est enrichi en glycosphingolipides et sphingomyéline, alors que le domaine apical est enrichi en phosphatidylcholine. Or une jonction serrée empêche l'échange lipidique à l'interface entre les deux domaines et permet le maintien de la composition de chaque domaine. La composition différente des domaines basolatéral et apical des cellules polarisées doit donc être expliquée par le transport des lipides nouvellement synthétisés vers le domaine approprié. La vérification expérimentale a été effectuée dans les cellules épithéliales MDCK : le glucosylcéramide (un glycolipide) est transporté préférentiellement vers la membrane apicale. L'hypothèse de l'existence des radeaux lipidiques a été proposée pour expliquer une telle asymétrie :

Simons et Van Meer proposent que des agrégats de glycosphingolipides, liés entre eux par des liaisons hydrogène, se forment sur le feuillet externe de la membrane de l'appareil de Golgi. Ces microdomaines sont supposés jouer le rôle de plateformes de tri pour les protéines destinées à être transportées vers la membrane apicale. C'est la première fois qu'apparaît la notion de *lipid rafts*. Cette hypothèse a été confirmée en 1992 par Brown et Rose pour les protéines ancrées GPI : leur ancre GPI joue un rôle déterminant dans leur transport vers la surface apicale [Brown 92].

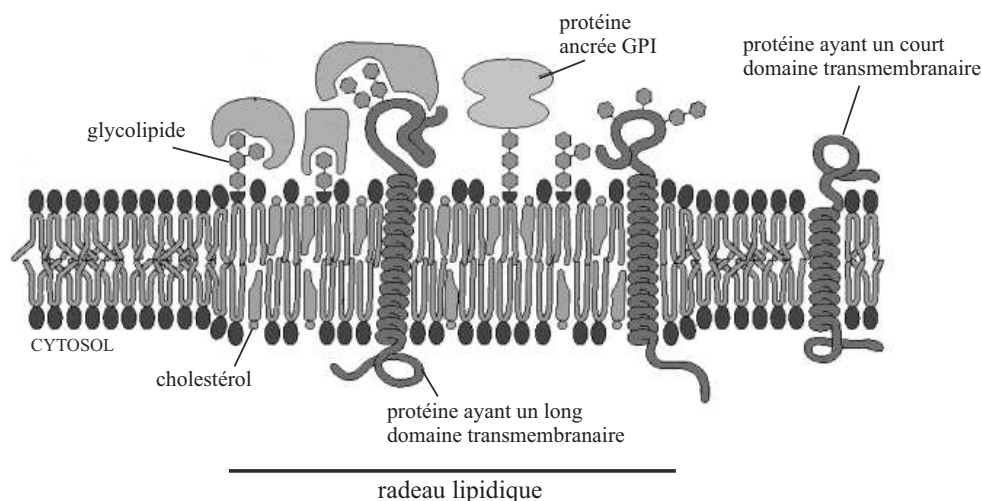


FIG. 1.21 – Modèle de radeau lipidique selon Simons et Ikonen (d'après [Alberts 02]). Dans ce modèle, les chaînes carbonées des sphingolipides sont majoritairement saturées et occupent moins d'espace latéral que leurs têtes hydrophiles ; les interstices sont comblés par des molécules de cholestérol (cf 1.5.1). Ces agrégats serrés de sphingolipides et cholestérol forment des plateformes mobiles au sein de phases plus fluides composées de phospholipides insaturés

Les expériences suivantes semblèrent confirmer l'existence de microdomaines enrichis en certains types de lipides et permirent d'affiner ce premier modèle [Simons 97]. Les microdomaines sont décrits comme des domaines des membranes cellulaires enrichis en cholestérol, glycolipides et sphingolipides. Les chaînes d'acides gras des phospholipides présents dans les radeaux lipidiques présentent moins d'insaturations que celles des lipides de la membrane environnante, ce qui permet un meilleur compactage des chaînes saturées des sphingolipides. La présence de cholestérol induit alors la formation de domaines *liquide ordonné* ayant une fluidité plus faible que le reste de la membrane. Certaines protéines peuvent s'insérer de façon sélective dans ces domaines, tandis que d'autres en sont exclues. Dans cette description, les radeaux lipidiques sont en fait conçus comme des *mottes de beurre* dérivant sur une *mer d'huile*. Cette description permet également de faire le rapprochement avec un type d'hétérogénéités membranaires qui avait déjà été reporté bien auparavant : les *caveolae* [Yamada 55]. Les *caveolae* sont de petites invaginations de la membrane plasmique qui peuvent être vues comme un sous-groupe de radeaux lipidiques. De

même que les radeaux lipidiques, elles sont enrichies en cholestérol et en glycosphingolipides ; néanmoins, elle se distinguent des radeaux lipidiques par le fait qu'elles contiennent également de la cavéoline-1 [Rothberg 92], une protéine se liant avec le cholestérol et responsable de la stabilité de la structure invaginée.

1.4.2 Les différents modèles proposés pour la description des microdomaines lipidiques

Si les radeaux lipidiques sont toujours conceptualisés comme des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et en glycosphingolipides, qui pourraient servir de plateforme pour la ségrégation des protéines et la signalisation, leurs caractéristiques restent mal connues. Différentes descriptions de microdomaines membranaires ont ainsi été proposées. Afin de ne pas engendrer de confusions avec ces différentes propositions, nous appellerons dorénavant radeau lipidique ou *lipid raft* un microdomaine membranaire enrichi en cholestérol et en sphingolipides.

Différents types de confinement peuvent être proposés pour modéliser un piégeage éventuel dans un radeau lipidique :

- le radeau lipidique peut former une phase gel ou une phase *liquide ordonnée*. Dans le premier cas, les molécules contenues dans le radeau lipidique sont immobiles (figure 1.22b) ; dans le second cas, les molécules peuvent diffuser à l'intérieur du radeau lipidique (figure 1.22c),
- le radeau lipidique peut constituer un piège pour certaines molécules (figure 1.22c) et un obstacle pour d'autres molécules (figure 1.22d),
- le radeau lipidique peut être immobile (figure 1.22c) ou diffuser plus ou moins rapidement (figure 1.22e),
- les frontières du radeau lipidique peuvent être imperméables (figure 1.22c et d) ou perméables (figure 1.22f) : le piégeage est alors transitoire ou total,
- les domaines peuvent être stables dans le temps ou non (figure 1.22g),
- enfin, l'ensemble peut être entièrement dynamique (figure 1.22h).

La description que l'on peut espérer obtenir à partir d'une série d'expériences dépend de la méthode utilisée. Ainsi, les méthodes de microscopie électronique ne peuvent pas donner accès à des informations dynamiques sur la structure des radeaux lipidiques tandis que les méthodes dynamiques telles que le Single Particle Tracking ne permettent généralement d'avoir qu'une vision locale du phénomène de diffusion.

1.4.3 Méthodes utilisées pour sonder la membrane cellulaire à la recherche des domaines lipidiques

Les différentes méthodes utilisées pour étudier la structure des membranes biologiques donnent des résultats qui peuvent sembler contradictoires de prime abord car toutes ne donnent pas accès au même type d'information. Différentes échelles spatiales ou temporelles peuvent être sondées selon la technique choisie. D'une part, il est possible, soit de réaliser une étude dynamique, soit de prendre une photographie à un instant t de la structure de la membrane. D'autre part, il faut distinguer

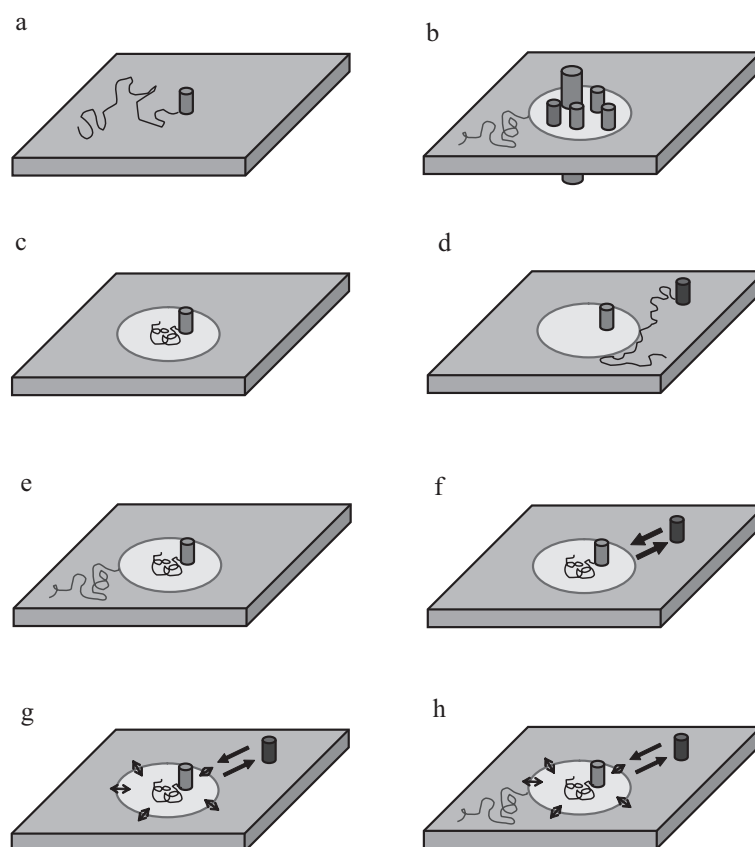


FIG. 1.22 – Modèles possibles de membrane contenant des radeaux lipidiques.

a) Pas de radeaux lipidiques. La molécule diffuse librement dans toute la membrane cellulaire. b) Les radeaux lipidiques sont des structures stables et mobiles ; les molécules restent immobiles à l'intérieur. c) Les radeaux lipidiques sont stables et immobiles. Les molécules ne peuvent diffuser qu'à l'intérieur de ces structures. d) Les radeaux lipidiques sont stables et immobiles. Les molécules ne peuvent diffuser qu'à l'extérieur de ces structures. e) Les radeaux lipidiques sont stables et mobiles. Les molécules diffusent librement à l'intérieur ou à l'extérieur, mais elles ne peuvent ni entrer ni sortir des radeaux. f) Les radeaux lipidiques sont stables et immobiles. Les molécules peuvent entrer et sortir de ces structures avec plus ou moins de facilité (partition dynamique). g) Les radeaux sont instables et immobiles. Les molécules peuvent entrer et sortir. h) Les radeaux sont instables et mobiles. Les molécules peuvent entrer et sortir.

les résultats obtenus par les méthodes permettant une étude globale de l'organisation membranaire et celles permettant une étude locale. Enfin, on peut noter que certaines méthodes de mesures ne permettent pas de séparer les différents types de membranes lors de l'analyse de leur organisation.

Depuis 1997, date d'apparition du nom de *lipid rafts*, le nombre d'articles faisant apparaître ces termes est déjà supérieur à 2000 ; une sélection nécessairement subjective a donc été réalisée quant aux travaux présentés dans cette section.

Méthodes biochimiques

Dès 1992, Brown et Rose identifient les radeaux lipidiques comme des zones de membranes enrichies en cholestérol et sphingolipides grâce à des méthodes d'extraction biochimiques. Ils montrent que des protéines ancrées GPI et les glycosphingolipides se retrouvent majoritairement dans les lysats de cellules épithéliales résistants aux détergents et de faible densité [Brown 92]. Pendant de nombreuses années, une telle caractérisation biochimique a constitué une définition pour les radeaux lipidiques.

Nous appellerons ici membranes résistantes aux détergents (*detergent-resistant membranes*, ou DRMs) les fractions de membranes biologiques isolées grâce à leur faible densité et leur insolubilité dans un détergent neutre (historiquement, le premier détergent utilisé est le Triton X-100 à 1% et à 4°C). L'hypothèse généralement admise est que les radeaux lipidiques s'identifient à ces DRMs, ce qui, nous le verrons par la suite, semble devoir être remis en question.

Méthode de préparation des DRMs à l'aide du Triton X-100 Après sonication des cellules et mise en contact du Triton X-100 et des membranes cellulaires à 4°C, de petites micelles (les fractions solubles dans le détergent, contenant entre autres de la phosphatidylcholine et certaines protéines) coexistent avec de plus grandes particules (les DRMs, contenant entre autre de la sphingomyéline, du cholestérol et des protéines ancrées GPI). Les DRMs peuvent alors être isolées par ultracentrifugation, et se retrouvent dans les fractions légères d'un gradient de saccharose [Brown 92].

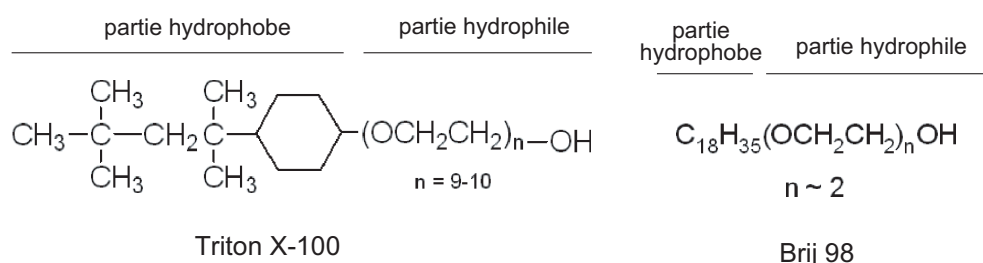


FIG. 1.23 – Structure de deux détergents utilisés pour l'extraction des DRMs et dérivés du polyéthylène glycol.

a) Triton X-100; b) Brij 98

Cette méthode de préparation solubilise toutes les membranes, à l'exception de la membrane nucléaire : les constituants de la membrane plasmique représente moins de 5% de la totalité des molécules analysées.

Utilisation d'autres types de détergents D'autres détergents peuvent être utilisés pour extraire les DRMs, comme le Brij 98. Il apparaît rapidement que, s'il existe un recouvrement non négligeable entre les molécules composant les DRMs préparées avec les différents détergents, leur composition exacte diffère. La comparaison entre

les compositions des DRMs extraites par différentes classes de détergents a ainsi été réalisée [Schuck 03] et laisse entrevoir la forte dépendance de la nature des molécules extraites en fonction de la méthode d'extraction utilisée.

D'autre part, l'extraction des DRMs en présence de Triton X-100 n'est possible qu'à une température de 4°C. Les DRMs obtenues par extraction sont-elles réellement une image de la structure de la membrane cellulaire à température physiologique ? L'abaissement de la température de 37°C à 4°C change l'état thermodynamique de la membrane, et est donc susceptible de provoquer un changement graduel de phase de la membrane [Brown 00]. D'autre part, le Triton X-100 apparaît comme ayant une capacité limitée à distinguer les domaines désordonnés des domaines ordonnés à l'intérieur des membranes cellulaires ; ainsi, une part non négligeable des phases *liquide ordonné* sont solubilisées par ce détergent, même à 4°C.

Afin de travailler à une température plus proche des conditions physiologiques, l'équipe de H.T. He a utilisé un autre détergent pour extraire les DRMs, le Brij 98 [Drevot 02]. Une fois encore, la composition des DRMs obtenues par ce traitement n'est pas identique à celle des DRMs obtenues par traitement avec le Triton X-100.

Quelle est alors la meilleure évaluation de la composition des radeaux lipidiques présents à la membrane des cellules vivantes ? En fait, l'utilisation de différents types de détergents peut être utile : chaque détergent s'insérant de façon différente à la limite entre les radeaux lipidiques et la membrane environnante, plus ou moins de molécules appartenant aux radeaux lipidiques sont sélectionnées. Ainsi, alors que les analyses biochimiques réalisées à 4°C avec le Triton X-100 montrent que le récepteur à la transferrine TfR se trouve seulement en dehors des radeaux lipidiques, celles réalisées à 37°C avec le Brij 98 montrent au contraire qu'une partie des protéines TfR se situe dans les radeaux lipidiques.

Lien entre DRMs et radeaux lipidiques ? La composition des DRMs semble bien cohérente avec celle des radeaux lipidiques. Cependant, l'hypothèse selon laquelle les molécules résistantes aux détergents préexistent en tant qu'agrégats au sein de la membrane cellulaire vivante reste sans justification.

L'utilisation de détergents tels que le Triton X-100 est en effet sujette à caution. Ainsi, sous certaines conditions de températures, lorsque du Triton est ajouté à un mélange de lipides formant une phase homogène, il induit la formation de domaines *liquide ordonné* qui sont eux-mêmes résistants à la solubilisation par le Triton [Heerklotz 02]. Le Triton pourrait donc bien être lui-même responsable de la formation des DRMs qu'il est censé isoler !

Il semble donc inadapté d'identifier les deux concepts de radeaux lipidiques et de DRMs [Lichtenberg 05]. Les DRMs sont le résultat de la solubilisation incomplète des membranes cellulaires dans un détergent donné ; elles n'existent qu'après le traitement des cellules par un détergent. La résistance au traitement pourrait être liée d'une part aux géométries relatives de certaines molécules membranaires et de certains détergents (certaines géométries sont en effet favorables à la formation de

micelles, et donc à la solubilisation), d'autre part à des facteurs cinétiques (la température et la durée du traitement influent sur le résultat de l'expérience). Les radeaux lipidiques sont, quant à eux, des domaines membranaires sans doute transitoires présents dans les cellules vivantes et enrichis en sphingolipides et en cholestérol. Leur durée de vie ainsi que leur taille et composition exacte restent mal connues. Étant donné la composition supposée des radeaux lipidiques, il semblerait qu'ils soient dans une phase *liquide ordonné* ; ceci implique que leur solubilisation par un détergent ne se fasse pas aisément.

Il faut noter d'autre part qu'une expérience indique que, lors de l'ajout de détergent Brij 98, le mélange entre lipides reste restreint. La possible contamination des DRMs par des protéines hétérologues a été testée par l'équipe d'H.-T. He dans [Montixi 98] : des thymocytes contenant de façon spécifique les protéines Thy 1.1 ou Thy 1.2 ont été mélangés avant de subir une sonication et le traitement par le Brij 98. L'immunomarquage par un anticorps anti-Thy 1.1 a montré que les DRMs obtenues ne contiennent à chaque fois que Thy 1.1 ou Thy 1.2 : on en déduit que lors de l'addition du détergent, les vésicules de DRMs ne piègent pas de façon artificielle du matériel soluble, ni ne fusionnent avec d'autres vésicules.

Enfin, afin de répondre aux critiques ciblant les utilisateurs de détergents, l'équipe de L. Pike a proposé une nouvelle méthode d'analyse biochimique d'isolement des radeaux lipidiques n'utilisant pas de détergent [Macdonald 05] : les radeaux lipidiques sont donc bien susceptibles d'exister préalablement au traitement par les détergents.

Les mesures de diffusion

Le Single Particle Tracking Cette technique a déjà été expliquée au paragraphe 1.3.2. Il est à noter que le marquage de la molécule dont on souhaite étudier le mouvement est réalisé soit par une bille de latex (200 à 500 nm de diamètre), soit par une particule d'or colloïdal (40 à 100 nm de diamètre). Le signal détecté par la caméra est alors la lumière détectée soit par transmission soit par rétro-diffusion sur la bille de latex ou la particule d'or. La cadence de la caméra est choisie entre une cadence vidéo habituelle (25 images/s) et une cadence beaucoup plus élevée (permettant une résolution temporelle de 25 μ s).

Cette technique permet d'obtenir un très bon rapport signal sur bruit et donc de localiser avec une très grande précision la molécule d'intérêt. L'utilisation d'une bille de latex ou d'une particule d'or colloïdal a également l'intérêt de pouvoir s'affranchir d'un éventuel problème de photoblanchiment. Néanmoins, la particule est de taille nettement supérieure à la molécule d'intérêt, ce qui pourrait engendrer des erreurs dans l'interprétation des résultats. En effet, des interactions non spécifiques avec la matrice extracellulaire pourraient ralentir de façon notable la diffusion de l'ensemble. Ensuite, il reste difficile de contrôler si le marqueur est bien lié à une seule molécule et non à plusieurs.

Si différentes équipes ont travaillé à partir de mesures de SPT, un consensus n'a pas encore été trouvé dans l'interprétation des résultats obtenus.

L'équipe de L. Salomé a ainsi étudié les mouvements d'un récepteur couplé aux protéines G attaché à une particule d'or colloïdal [Daumas 03]. La particule d'or a été suivie par nanovidéomicroscopie pendant 2 min, avec une résolution temporelle de 40 ms et une précision spatiale de 15 nm. Il a été montré que 90% des récepteurs étudiés ont un mouvement de diffusion totalement confiné à l'intérieur de domaines de diamètre moyen de 150 ± 100 nm, qui eux-mêmes diffusent librement dans la membrane. Un tel résultat s'explique par l'existence d'un puits de potentiel quadratique, pouvant être éventuellement modéliser un radeau lipidiques mais n'étant pas expliqué par la présence de barrières de type cytosquelette.

L'équipe de Jacobson a étudié le mouvement de diverses molécules supposées avoir plus ou moins d'affinité pour les radeaux lipidiques [Dietrich 02]. Des zones de confinement transitoire (*Transient Confinement Zones*, ou TCZs) avaient déjà été détectées par SPT [Simson 95, Sheets 97]. Dans ces zones d'environ 200 à 300 nm de diamètre, les particules peuvent être piégées pendant 5 à 10 s. Les particules préférentiellement piégées dans ces TCZs étant les protéines ancrées GPI ainsi que le glycosphingolipide G_{M1} [Sheets 97], elles semblaient avoir quelques traits communs avec les radeaux lipidiques. L'étude a été réalisée de façon systématique dans l'article [Dietrich 02] et montre que la protéine Thy-1, les protéines ancrées GPI ainsi que le glycosphingolipide G_{M1} passent plus de temps que les deux lipides DOPE et DPPE dans ces TCZs. De plus, le nombre et la taille de ces TCZs diminuent après déplétion en cholestérol par traitement des cellules à la $M\beta CD$ (methyl- β -cyclodextrine) [Dietrich 02]. D'autre part, le coefficient de diffusion microscopique à l'intérieur des TCZs est deux fois plus faible que celui à l'extérieur, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'une phase *liquide ordonné* riche en cholestérol. Il semblerait donc que l'on puisse identifier les TCZs étudiées par Jacobson avec les radeaux lipidiques tels qu'ils ont été définis jusqu'ici (dans ce même article, une autre hypothèse est néanmoins émise : les radeaux lipidiques pourraient être de taille bien inférieure et diffuser à l'intérieur des TCZs, être piégés pendant environ 5 s, puis en sortir...). Il apparaît dans leur étude que l'abondance des TCZs est indépendante de la température, et que la diffusion à l'intérieur de ces zones n'est que deux fois plus lente qu'à l'extérieur. Les temps de piégeage mesurés ne seraient donc pas seulement dus à une plus forte viscosité à l'intérieur des TCZs, mais aussi à l'existence de barrières. Ces barrières pourraient être les frontières entre différentes phases lipidiques, et/ou liées à la présence du cytosquelette.

Néanmoins, l'équipe de Kusumi rapporte également que la molécule CD-59, ancrée à la membrane par une ancre GPI, diffuse aussi rapidement que le lipide DOPE, supposé sans affinité pour les radeaux lipidiques. Ceci ne peut être expliqué si CD-59 se situe dans un radeau lipidique de taille et de durée de vie conséquentes. Dans une cellule au repos, les radeaux lipidiques seraient donc des structures petites et/ou instables. Le confinement transitoire dans les TCZs n'est détecté que lorsque la cellule n'est plus au repos, c'est-à-dire en réponse à un événement de signalisation [Subczynski 03] : après activation, les petites structures instables coalescent et se stabilisent.

Mesure de diffusion locale par piégeage optique Afin de sonder à la fois la taille et le comportement dynamique des radeaux lipidiques de la membrane des cellules vivantes, l'étude de la diffusion locale de protéines uniques est réalisée. Pour cela, un piège optique est utilisé pour confiner la diffusion d'une bille fluorescente attachée à la protéine d'intérêt [Pralle 00]. La mesure des fluctuations thermiques de position de la bille fluorescente dans le piège harmonique constitué par le laser est alors réalisée avec une très grande précision. En supposant que l'amortissement est essentiellement dû à la force de traînée exercée par la bicouche lipidique sur la protéine d'intérêt, il est possible d'estimer la traînée de viscosité ($\gamma = F_{\text{traînée}}/v$).

Les mesures effectuées avec cette méthode sur des protéines supposées être associées aux radeaux lipidiques ont montré une très grande stabilité de l'association protéine-radeau. De plus, plusieurs arguments tendent à prouver que le radeau lipidique diffuse comme une seule entité. D'une part, la valeur de la traînée de viscosité dépend très peu de la nature de l'attachement de la protéine à la membrane (ancrage GPI ou domaine transmembranaire), mais dépend fortement de son appartenance à un radeau lipidique. Les protéines supposées être dans les radeaux lipidiques (protéines ancrées GPI et protéines transmembranaires) ont une traînée de viscosité trois fois supérieure à celle des protéines se trouvant hors des radeaux lipidiques. Après déplétion en cholestérol de la membrane par traitement à la M β CD, la traînée de viscosité ne dépend plus de l'appartenance des protéines aux radeaux lipidiques, mais de la nature de leur ancrage à la membrane. Avant traitement, les protéines diffusent donc comme si elles étaient toutes attachées à un même domaine membranaire stable, dont on peut alors déterminer la taille moyenne, en s'appuyant sur le modèle de Saffman et Delbruck [Saffman 75].

Ces mesures permettent une représentation des radeaux lipidiques comme des complexes stabilisés par le cholestérol, d'une taille de 26 ± 13 nm, et diffusant comme une entité pendant des durées de l'ordre de quelques minutes [Pralle 00].

Mesures de FRAP réalisées à un seul rayon d'observation Dans la méthode de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence Recovery After Photobleaching* ou FRAP), une excitation lumineuse brève et intense photodétruit les fluorophores situés dans une petite zone de la membrane. L'étude des mouvements des molécules fluorescentes provenant de la surface contiguë à la zone photoblanchie est réalisée en enregistrant la fluorescence émise à faible intensité d'éclairement. En mesurant l'intensité et le taux de recouvrement de la fluorescence (figure 1.24), l'expérimentateur a alors accès à deux grandeurs cinétiques : le coefficient de diffusion et la fraction mobile des molécules fluorescentes. Afin d'optimiser la détermination de ces deux grandeurs, la fonction d'ajustement doit être choisie en fonction des géométries de la structure à sonder et du profil d'éclairement utilisé pour photoblanchir l'échantillon. Différentes propositions de fonctions d'ajustement sont rappelées dans [Klonis 02].

Une des limitations de cette méthode est la difficulté d'interprétation des résultats : de nombreux phénomènes peuvent affecter le recouvrement de fluorescence,

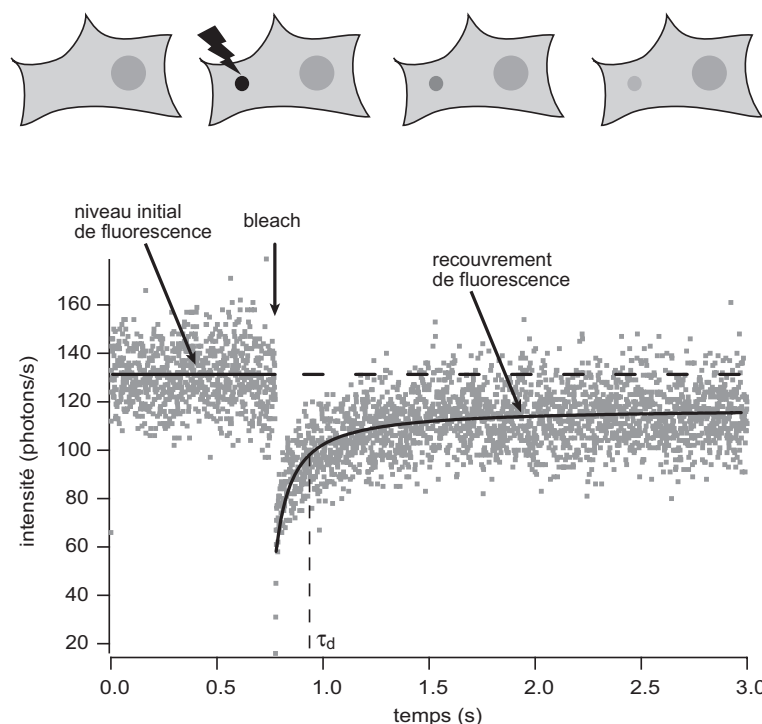


FIG. 1.24 – Principe du FRAP.

Dans le cas d'une distribution homogène d'une population moléculaire fluorescente, on peut éteindre de manière irréversible sa fluorescence dans une zone restreinte de l'échantillon par photoblanchiment en exposant très brièvement cette zone à un flash lumineux réalisé par un laser. On crée ainsi deux populations de molécules (l'une d'entre elles seulement étant fluorescente) spatialement distinctes. Si les molécules sont capables de se déplacer dans le milieu, on assiste à une redistribution des deux populations entre la zone blanchie et le milieu adjacent jusqu'à homogénéisation des populations : la zone photoblanchie redevient progressivement fluorescente. L'analyse de la cinétique de récupération de fluorescence permet de déduire le coefficient de diffusion latérale D , caractéristique de la vitesse de déplacement des molécules dans le milieu (plus la vitesse de diffusion est élevée, plus la fluorescence ré-augmente rapidement). Le niveau de fluorescence obtenu après un temps long après l'étape de photoblanchiment n'est pas nécessairement aussi élevé que le niveau de fluorescence initial. Cette différence permet d'évaluer la fraction mobile M de fluorophores, c'est-à-dire le nombre de fluorophores qui diffusent rapporté au nombre total de fluorophores. La courbe expérimentale correspond à une expérience de FRAP en configuration spot (waist de 340 nm) avec un échantillonnage de 1 ms, permettant l'étude de la protéine de fusion GFP-EGFR.

tels que des mouvements inopinés de la membrane, des interactions moléculaires ou du trafic membranaire. Elle n'a pas non plus la résolution spatiale et temporelle accessible par SPT, puisque la mesure s'effectue sur un ensemble de molécules. Enfin, il faut noter que ce type de mesure est réalisé sur un système hors équilibre.

Il existe deux méthodes de FRAP : la configuration *spot* consiste à réaliser la mesure dans un volume confocal, alors que la configuration *confocale* consiste à balayer le volume confocal sur une petite surface de membrane. La configuration *confocale*

améliore nettement le rapport signal sur bruit mais les mesures possèdent des erreurs systématiques difficilement contournables. En effet, le balayage de la petite surface de membrane prend un temps non négligeable devant le temps caractéristique de diffusion. De plus, les fonctions d'ajustement de recouvrement de la fluorescence sont dans ce cas délicates à utiliser.

Néanmoins, de nombreux travaux reposent sur cette technique. Notons en particulier le travail de A. Kenworthy [Kenworthy 04], qui a mesuré les coefficients de diffusion de différentes molécules membranaires ayant plus ou moins d'affinité supposée pour les radeaux lipidiques, avant et après déplétion en cholestérol par la M β CD. Il apparaît que les protéines supposées être associées aux radeaux lipidiques diffusent librement sur de grandes distances, avec des coefficients de diffusion pouvant varier d'un ordre de grandeur : elles ne diffusent donc pas comme une entité, comme le suggèrent les résultats de A. Pralle [Pralle 00]. De plus, le traitement par la M β CD induit des effets similaires pour toutes les protéines membranaires, supposées être associées aux radeaux lipidiques ou non. A. Kenworthy conclut que l'association avec des radeaux lipidiques n'est donc pas le mécanisme dominant contrôlant la mobilité des protéines à la membrane.

FRAP à rayon d'observation variable Dès 1987, Edidin propose de réaliser non plus une seule mesure de FRAP à un rayon d'observation fixe, mais de travailler avec différents objectifs de microscopes ayant des grandissements et des ouvertures numériques différents. Dans l'article [Yechiel 87], huit mesures de FRAP sont réalisées avec des rayons d'observation variant de 0,35 μm à 5,0 μm . Edidin étudie les variations du coefficient de diffusion D et de la fraction mobile M en fonction du rayon d'observation w pour un lipide marqué NBD : NBD-PC, ainsi que des protéines marquées par des fragments Fab conjugués à la fluorescéine. Dans le cas d'une diffusion libre, D et M sont deux grandeurs invariantes lorsque w varie (comme cela a été vérifié dans un liposome géant), alors que les mesures effectuées dans des fibroblastes montrent que D et M varient lorsque l'on modifie le rayon d'observation. Edidin observe d'abord que la fraction mobile mesurée M est une fonction décroissante de w . De plus, le coefficient de diffusion de NBD-PC augmente lorsque w augmente avant d'atteindre un plateau pour les grandes valeurs de rayon d'observation (voir figure 1.25a). On peut déjà noter que ce plateau n'est plus visible avec le choix effectué dans cette thèse d'étudier les phénomènes de diffusion en traçant le temps de diffusion en fonction de la surface d'observation (figure 1.25c). Enfin, les valeurs du coefficient de diffusion mesurées pour de petites tailles de volume confocal dépendent de la position choisie pour réaliser la mesure, indiquant une hétérogénéité de la membrane sondée. Il conclut alors que les membranes des fibroblastes sont composées de domaines riches en protéines d'environ 1 μm de diamètre, entourés d'un continuum lipidique plus pauvre en protéines.

Edidin a ensuite affiné son modèle dans l'article [Edidin 91b]. La même méthode a également été utilisée pour l'étude de la diffusion latérale de protéines membranaires ayant des parties cytosoliques plus ou moins longues afin de tester l'hypothèse

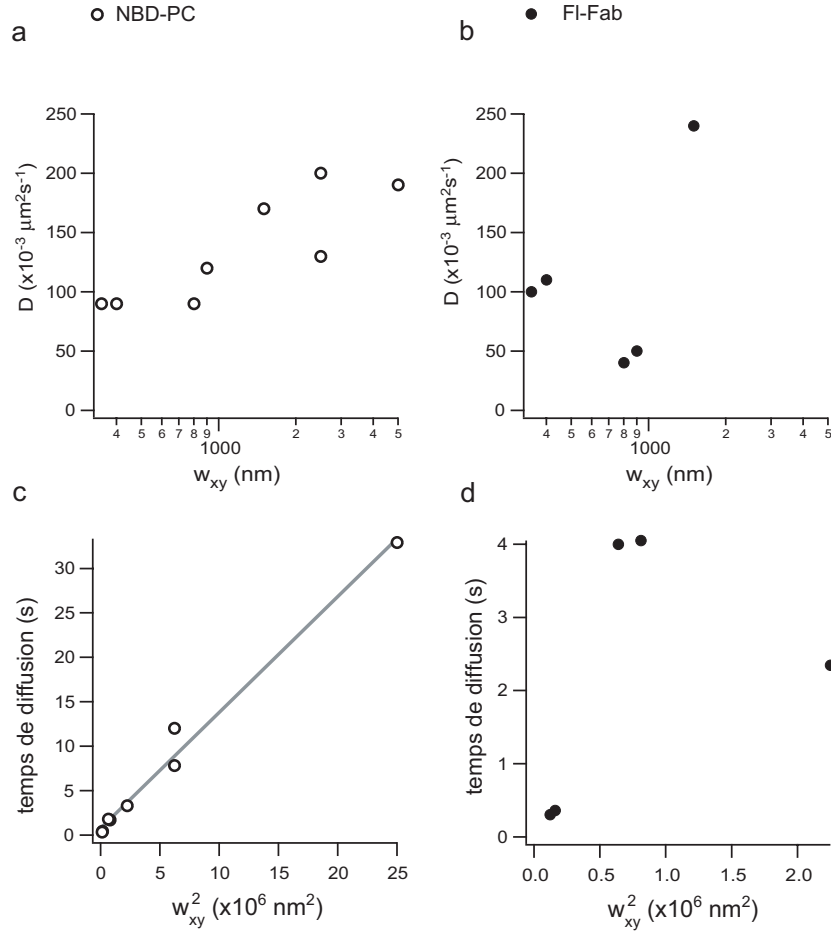


FIG. 1.25 – FRAP à rayon variable : lois de diffusion obtenues par Edidin pour l'analogue lipidique NBD-PC et des protéines marquées par une fragment Fab conjugué à la fluorescéine. Les figures a) et b) sont celles proposées dans l'article expérimental [Yechiel 87]. Les figures c) et d) ont été construites à partir des résultats expérimentaux de l'article, en choisissant une présentation cohérente avec celle choisie pour exposer les résultats expérimentaux de cette thèse.

de l'existence de barrières à la diffusion [Edidin 94]. Cette méthode de mesure à rayon variable est néanmoins restée relativement confidentielle par la suite : à ma connaissance, seules deux autres équipes ont pris la suite de ce travail.

L'équipe de A. Lopez a ainsi travaillé à l'interprétation des dépendances de M et D en fonction de w^2 . Ils ont d'abord simulé des expériences de FRAP réalisées sur une surface sur laquelle sont distribués des obstacles imperméables circulaires, immobiles et ne se recouvrant pas [Schram 94]. Les résultats montrent que M varie en $1/w$, w étant le rayon d'observation, alors que le coefficient de diffusion D est donné en fonction du rayon moyen des obstacles de leur fraction surfacique et de w . Cette étude théorique leur a d'ailleurs permis de réinterpréter les résultats expérimentaux de [Yechiel 87]. Dans [Salomé 98], les obstacles simulés sont des barrières de type cytosquelette, qui forment un réseau hexagonal. Des simulations de Monte Carlo

leur ont ensuite permis d'établir (i) la relation de proportionnalité entre la fraction mobile M des particules diffusantes et le rapport entre la taille r des domaines (r étant le côté des hexagones réguliers utilisés dans la simulation) et le rayon d'observation w , ainsi que (ii) une relation entre le coefficient de diffusion apparent D et le coefficient de diffusion réel D_{micro} des particules à l'intérieur des domaines. Leur modèle leur permet également d'annoncer si les barrières induisent un confinement total ou non. Cette méthode a été utilisée dans [Cézanne 04], article dans lequel l'équipe étudie la diffusion des récepteurs NK2 avant et après stimulation par l'agoniste NKA. Avant activation, seuls 30% des récepteurs sont confinés dans de larges zones de confinement de rayon moyen 420 nm, alors que le reste des récepteurs diffuse librement dans le reste de la membrane. Deux modèles sont proposés pour expliquer les mesures réalisées après activation : dans chacun de ces modèles, la taille moyenne des zones de confinement est réduite à 170 nm alors que le nombre total de récepteurs piégés dans les domaines reste constant. Dans le premier modèle, le nombre des zones de confinement augmente, la densité des récepteurs restant inchangée. Dans le second modèle, le nombre des zones de confinement reste identique mais la densité de récepteurs augmente. Des expériences complémentaires réalisées sur des lipides membranaires ont permis de trancher en faveur du second modèle.

La dernière équipe travaillant sur la méthode de FRAP à rayon variable est celle de Henis. Afin de vérifier si la diffusion d'une particule membranaire se fait uniquement en deux dimensions ou s'il existe également des échanges de particules entre la membrane et le cytoplasme, cette équipe réalise la mesure du temps de recouvrement de fluorescence avec deux objectifs de grandissements différents ($\times 40$ et $\times 63$). Le rapport $\tau(\times 40)/\tau(\times 63)$ est ensuite calculé : s'il est de l'ordre de 2,56, la diffusion se fait uniquement dans le plan de la membrane ; s'il est égal à 1, le recouvrement de fluorescence dans la membrane se fait uniquement par échange avec le cytoplasme [Rotblat 04]. Nous reviendrons sur l'interprétation de cette expérience dans la section 5.2.5.

Mesures FCS sur membrane Les mesures de diffusion par FCS sur les membranes cellulaires seront développées dans la section 2.5. Nous verrons dans cette section que les travaux menés jusqu'ici sont souvent limités par la difficulté du choix de l'ajustement des résultats expérimentaux. L'expérimentateur est souvent obligé de choisir entre un ajustement correspondant à une espèce diffusant librement, plusieurs espèces diffusant librement, ou bien encore à une diffusion anormale, dans laquelle le coefficient de diffusion est une fonction décroissante du temps. Toutes les précisions seront données dans la section 2.5.

Les méthodes locales de mesure de l'environnement de proximité

La microscopie électronique en transmission La technique de microscopie électronique en transmission utilise un système de lentilles magnétiques permettant de dévier ou de focaliser un faisceau d'électrons sur un échantillon extrêmement fin, l'image obtenue étant enregistrée sur un film photographique. Théoriquement,

la résolution devrait être de l'ordre de la longueur d'onde de l'électron (pour des électrons accélérés à 100 kV, cela correspondrait à une résolution d'environ un picomètre); l'optique électronique n'étant pas très performante, la résolution est en réalité de l'ordre de quelques angströms. D'autre part, la sonde a une taille minimale de 5 nm et est attachée à la molécule d'intérêt par l'intermédiaire d'un anticorps de 2 nm de long. La rotation de la bille autour de la molécule est donc possible, avec un rayon d'environ 7 nm.

La microscopie électronique par transmission a permis d'obtenir des renseignements topographiques sur la structure membranaire avec une très haute résolution spatiale. À l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt et avec un anticorps secondaire couplé à une bille d'or, il est en effet possible de faire de l'immunomarquage ultra structural afin d'étudier la localisation de cette protéine dans la membrane cellulaire. Une étape délicate est la réalisation d'échantillons de membrane : la surface apicale de cellules adhérentes est arrachée à l'aide d'une grille de microscopie électronique. Après immunomarquage, l'échantillon est fixé et déshydraté avant observation.

Une analyse statistique de la répartition des billes d'or à la surface de la membrane est alors nécessaire pour déterminer si la distribution est aléatoire ou montre une agrégation. L'approche statistique repose sur la mesure des distances entre plus proches voisins et l'utilisation de la fonction K de Ripley [Ripley 77] ou ses diverses améliorations (notamment la fonction $L(r) - r$, avec $L(r) = \sqrt{K(r)/\pi}$).

L'équipe de B.S. Wilson a ainsi pu montrer que si la distribution des lipides G_{M1} est aléatoire, les autres molécules supposées avoir une affinité pour les radeaux lipidiques, telles que les protéines Thy-1 ou LAT, sont distribuées en agrégats [Wilson 04]. Néanmoins, il n'y a pas colocalisation de ces différents marqueurs sur les membranes de cellule à l'état de repos. Après activation par réticulation des protéines Thy-1, Thy-1 forme des agrégats dans lesquels se localisent également les molécules LAT, mais pas les G_{M1} .

L'équipe de Hancock a, quant à elle, étudié la distribution des protéines de la famille Ras (H-Ras, K-Ras et N-Ras), situées sur le feuillet interne de la membrane plasmique. L'analyse de la microlocalisation des protéines Ras montre que les protéines H-Ras inactivées sont distribuées dans les radeaux lipidiques ainsi que dans des domaines indépendants de la composition en cholestérol. Au contraire, les formes activées de H-Ras et K-Ras résident essentiellement dans des domaines indépendants du cholestérol [Prior 03].

Cette méthode d'étude de la localisation de protéines à la surface de la membrane possède néanmoins de sérieux inconvénients. En particulier, il est certain que la méthode d'arrachement de la membrane plasmique ne permet que de récupérer des lambeaux de membrane sur la grille de microscopie électronique. Comment savoir si la mesure d'une agrégation n'est pas due à l'existence de trous dans la surface étudiée? De plus, l'échantillon prélevé subit une déshydratation, ce qui provoque un compactage de la membrane plasmique, augmentant la probabilité d'induire artificiellement une agrégation des protéines. Enfin, on ne peut travailler qu'avec des

cellules mortes.

Les microscopies en champ proche Dans les microscopes en champ proche une sonde est déplacée à la surface de l'objet étudié et maintenue en contact ou à très faible distance de celui-ci, au moyen d'une boucle de rétroaction.

Si les méthodes d'imagerie par microscopie de force atomique n'ont pu être utilisées que sur les membranes modèles (voir section 1.5), la microscopie en champ proche optique (*Near-field scanning optical microscopy*) a permis de réaliser des images de cellules permettant la détection de molécules uniques avec une résolution optique nanométrique (<90 nm) et l'obtention d'une information topographique.

Dans le cas du NSOM, la lumière est apportée et récupérée par une fibre optique ; la surface observée est limitée par un trou plus petit que la longueur d'onde de la lumière. Le détecteur de lumière est placé à une distance suffisamment faible de la surface pour observer l'onde évanescente et non pas l'onde dispersée. Des détails plus petits que la longueur d'onde de la lumière peuvent alors être visualisés. L'utilisation d'une *cloche de plongée* proposée par l'équipe de M.F. Garcia-Parajo constitue une amélioration notoire permettant de travailler sur des échantillons hydratés. Seule la pointe est immergée, alors que la sonde de diapason vibre dans l'air, permettant ainsi de conserver une régulation facile et fiable de la distance entre la pointe et l'objet. La détection de molécules fluorescentes individuelles sur une membrane cellulaire en solution est alors possible avec une résolution spatiale nanométrique [Koopman 04]. L'acquisition d'une image étant réalisée par balayage de la pointe, il est nécessaire de fixer les cellules dans du paraformaldéhyde, afin d'éviter d'éventuels mouvements de la cellule au cours de l'acquisition de l'image : les cellules ne sont donc pas vivantes. Cette équipe travaille actuellement à l'étude de la colocalisation des protéines et lipides susceptibles d'être associés dans les radeaux lipidiques (*non publié*).

Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET) Le FRET provient d'une interaction dipôle-dipôle entre un donneur et un accepteur distants de quelques dizaines d'angströms. Dans ce processus, l'énergie est transférée de façon non radiative, d'un fluorophore dans un état excité (donneur) à un fluorophore dans l'état fondamental.

Afin que ce transfert d'énergie ait lieu, le donneur et l'accepteur doivent être situés à une distance relative égale environ à un rayon de Förster, généralement compris entre 30 et 60 Å. L'efficacité du transfert d'énergie décroît très rapidement lorsque la distance entre donneur et accepteur augmente. Cet outil permet donc d'étudier les interactions à très courte distance entre deux molécules.

L'efficacité du transfert d'énergie dépend également de l'orientation relative des moments dipolaires des deux fluorophores ; elle est maximale si les deux dipôles sont orientés dans le même sens. Le FRET nécessite de choisir un couple donneur-accepteur tel que le spectre d'absorption de l'accepteur chevauche le spectre d'émission du donneur. Un inconvénient est alors que le spectre d'émission de l'accepteur peut chevaucher le spectre d'émission du donneur : des filtres de bande passante

étroite sont alors nécessaires pour distinguer la lumière de fluorescence et la lumière émise par FRET. L'homo-FRET est une technique particulière dans laquelle le donneur et l'accepteur sont de même nature, par opposition à l'hétéro-FRET.

Cette technique a été mise en oeuvre par l'équipe de Mayor [Sharma 04] afin de déterminer la taille des agrégats de protéines ancrées par GPI dans les membranes plasmiques des cellules vivantes. Les expériences sont menées en utilisant des mesures de décroissance d'anisotropie résolues en temps : les fluorophores subissant de l'homo-FRET possèdent un temps caractéristique supplémentaire de décroissance d'anisotropie. Puisque ce sont les fluorophores dont l'orientation du dipôle est parallèle à la direction de polarisation de la lumière incidente qui sont excités, la lumière de fluorescence est polarisée en l'absence de FRET ; en présence de FRET, les fluorophores qui émettent de la lumière ne sont pas ceux qui absorbent la lumière, et ont donc une orientation aléatoire. La perte d'anisotropie d'émission de fluorescence due au FRET s'explique de la façon suivante : en l'absence de FRET, les fluorophores qui émettent de la fluorescence sont les mêmes que ceux qui ont absorbé la lumière. Si la lumière incidente est polarisée, la lumière émise l'est aussi, puisque seuls les dipôles alignés avec la direction de polarisation de la lumière incidente sont excités puis émettent de la fluorescence. En présence de FRET, les fluorophores qui absorbent la lumière et ceux qui émettent de la fluorescence ne sont pas les mêmes. L'orientation relative du donneur et de l'accepteur étant aléatoire, l'anisotropie de fluorescence est plus faible.

L'interprétation de ces mesures d'anisotropie de fluorescence montrent que les protéines ancrées par GPI sont présentes dans la membrane plasmique sous forme de monomères, alors qu'une plus petite fraction (20 à 40% des protéines) forme des agrégats de taille nanoscopique (< 5 nm) sensibles à la présence de cholestérol. Ces agrégats sont composés au maximum de quatre molécules [Sharma 04].

Il faut noter néanmoins que la résolution temporelle est faible puisqu'une image n'est prise que toutes les 4 s. De plus, seule la sous-population de la GFP ayant la bonne orientation peut être observée.

1.4.4 Rôle biologique des radeaux lipidiques

Initialement, l'explication du rôle biologique des radeaux lipidiques était fondée sur l'hypothèse de l'existence d'un couplage entre les deux feuillet de la membrane cellulaire : les radeaux lipidiques présents sur le feuillet externe seraient connectés avec des domaines lipidiques sur le feuillet interne. Les radeaux lipidiques pourraient alors servir de "plateformes de signalisation", permettant de coupler les événements arrivant par l'extérieur de la cellule à la chaîne de signalisation intérieure à la cellule. Les radeaux lipidiques jouent peut-être un rôle dans la signalisation par les récepteurs des cellules T, les récepteurs des cellules B, les récepteurs IgE, les facteurs neurotrophiques, les facteurs de croissance, les chemokines, les interleukines et l'insuline [Bromley 01, Paratcha 02].

Plusieurs études montrent que des radeaux lipidiques ayant des compositions protéiques et/ou lipidiques distinctes coexistent dans les cellules [Madore 99, Drevot 02]. Ces différentes populations de radeaux lipidiques pourraient être mobilisées, en réponse à un stimulus, dans des régions différentes de la cellule.

Selon un premier modèle, les radeaux lipidiques permettent la colocalisation des molécules nécessaires à la signalisation, facilitant ainsi leur interaction. Dans un seul radeau lipidique doivent donc se trouver les récepteurs, les facteurs de couplage, et les effecteurs. Cette organisation permettrait une transduction du signal efficace grâce à une grande proximité des différents acteurs de la réponse à un stimulus extérieur.

Un deuxième modèle propose que, lors de la réception d'un stimulus, l'agrégation des récepteurs déclenche l'agrégation de petits domaines, aboutissant à la formation de domaines membranaires de taille plus importante. Ce mécanisme permettrait la mise en contact des molécules nécessaires à la signalisation, isolées dans de plus petits domaines tant que la cellule est au repos [Simons 00, Anderson 02, Subczynski 03].

1.5 Le travail réalisé sur membranes modèles

Une membrane modèle est un monocouche ou une bicouche lipidique dont la composition est choisie et contrôlée par l'expérimentateur. Il est préférable de travailler sur des bicouches lipidiques qui reproduisent mieux la membrane cellulaire.

Les propriétés physico-chimiques des membranes peuvent être étudiées grâce à :

- des techniques thermodynamiques :
 - les mesures calorimétriques (*Differential Scanning Calorimetry*, ou DSC),
 - les mesures d'aire occupée par tête de lipide (*surface pressure-area isothermes*),
- des techniques spectroscopiques :
 - résonance magnétique nucléaire,
 - ESR,
 - spectroscopie infra-rouge,
 - extinction de fluorescence (*fluorescence quenching*),
 - FRET
- des techniques analytiques :
 - spectrométrie de masse,
 - ultracentrifugation et gradient de densité,
- ainsi que des techniques de microscopie :
 - microscopie électronique,
 - microscopie par force atomique,
 - microscopie en champ proche optique,
 - imagerie par fluorescence (microscopie confocale ou microscopie multiphotonique),
 - mesures de diffusion par FRAP, FCS et SPT.

Ces études permettent de tracer les diagrammes de phase de mélanges lipidiques.

Les phases des mélanges lipidiques

Nous avons déjà étudié les différentes phases d'un seul type de phospholipides dans la section 1.2.1 : ils peuvent exister dans deux phases : la phase solide (appelée phase gel et notée s_o) au-dessous de la température de fusion T_m et la phase fluide (appelée phase liquide désordonné et notée l_d) au dessus de la température de fusion. On peut noter que la phase solide ne semble pas avoir d'existence au sein de la cellule vivante ; la présence d'une double liaison *cis* dans une chaîne d'acide gras des phospholipides réduit la température de fusion en empêchant un trop grand rapprochement des chaînes d'acides gras. Ceci permet d'assurer un état fluide à la membrane cellulaire à des températures physiologiques.

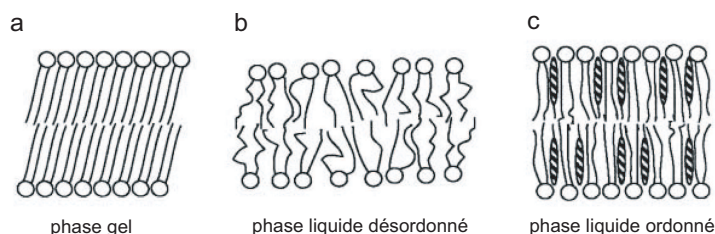


FIG. 1.26 – Structure des bicouches lipidiques.

Les bicouches constituées d'un seul type de phospholipides sont dans une phase gel (s_o) en-dessous de leur température de fusion T_m ; au-dessus de cette température, les lipides sont dans une phase liquide désordonné (l_d). L'insertion de cholestérol dans la bicouche permet l'obtention de la phase liquide ordonné, notée l_o . D'après [Munro 03]

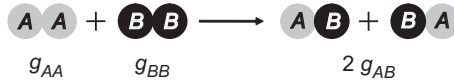
L'addition d'une quantité importante de cholestérol dans la bicouche lipidique modifie largement sa fluidité [Yeagle 85, Ohvo-Rekila 02]. L'insertion de cholestérol dans la bicouche ordonne les chaînes carbonées des phospholipides en phase l_d ou, au contraire, fluidifie la phase gel, permettant l'obtention d'un état intermédiaire appelé phase *liquide ordonné*, notée l_o (figure 1.26). La rigidité des quatre cycles carbonés tend en effet à compacter les chaînes d'acides gras des phospholipides à l'état fluide et à épaissir la bicouche. L'insertion du cholestérol réduit donc la perméabilité de la bicouche, en empêchant la déformation nécessaire aux passages de molécules dans la direction orthogonale à la bicouche. Mais elle n'a qu'un effet réduit sur la vitesse de diffusion dans le plan de la bicouche. Cette nouvelle phase correspond à un ordre conformationnel élevé (semblable à celui de la phase s_o) et un ordre translationnel faible (semblable à celui de la phase l_d). Lorsque le cholestérol est inséré dans une bicouche lipidique en phase fluide, il empêche les mouvements des chaînes d'acide gras des phospholipides, rendant la bicouche moins fluide et réduisant sa perméabilité aux petites molécules. Lorsqu'il est inséré dans une bicouche en phase gel, il a l'effet opposé : en empêchant les interactions entre chaînes carbonées, il maintient une certaine fluidité de la membrane.

1.5.1 Systèmes lipidiques binaires

Un système binaire dans lequel deux phases coexistent possède une variance égale à deux : à pression fixée, il existe une gamme de température permettant cette coexistence.

L'enthalpie libre d'interaction entre deux lipides

Il est possible de réaliser l'étude thermodynamique d'un système lipidique binaire. Travaillant avec un fluide à température et à pression constante, l'enthalpie libre est un potentiel thermodynamique pour ce système. Soit une bicouche lipidique constituée de deux types de lipides A et B , on peut évaluer l'enthalpie libre de la réaction d'échange entre deux couples de lipides identiques [Almeida 05] :



L'enthalpie libre de réaction est donnée par :

$$\omega_{AB} = 2g_{AB} - g_{AA} - g_{BB}$$

L'intérêt de cette grandeur ω_{AB} est que la variation d'enthalpie libre correspondant à l'échange de position entre deux lipides voisins est un multiple de ω_{AB} .

La variation d'enthalpie libre correspondant à la réaction d'échange peut être expliquée par :

- la différence longueur de chaîne carbonée entre les deux lipides (*hydrophobic mismatch*)
- la nature des résidus attachés à chaque chaîne carbonée,
- la différence des forces de Van der Waals exercées entre les chaînes carbonées.

[Almeida 05] montre que la plupart des interactions entre deux lipides sont répulsives ($\omega_{AB} > 0$), ce qui signifie que les lipides tendent à être entourés de voisins de même nature et donc à former des domaines. Néanmoins, quelques interactions sont attractives, notamment dans le cas d'une phosphatidylcholine à longues chaînes avec le cholestérol.

Mélange de deux types de phospholipides ayant des températures de fusion très différentes

Les membranes composées de deux types de phospholipides présentent une séparation de phase en deux phases s_o et l_d à des températures comprises entre les températures de fusion des deux lipides en présence. De tels résultats ont été obtenus pour des lipides PC ayant des longueurs de chaînes différentes, mais aussi pour des mélanges de lipides ayant des têtes polaires différentes [Shimshick 73] ou des mélanges de lipides saturés et insaturés.

La méthode la plus largement utilisée pour étudier un changement de phase s_o/l_d est la calorimétrie, car l'enthalpie de changement de phase est importante

(≈ 8 Kcal/mol) et donc aisément détectable. Mais le tracé de diagramme de phase ne permet pas d'obtenir d'information sur la forme ou la taille des domaines. Des images de GUVs ont été obtenues par microscopie de fluorescence [Bagatolli 00] et ont permis une observation directe des mélanges lipidiques binaires. En effet, certains analogues lipidiques fluorescents (tels que le Laurdan) ont des caractéristiques spectrales différentes selon l'ordre de leur chaîne carbonée. De telles sondes permettent de mesurer à la fois l'organisation latérale et le degré d'ordre des chaînes carbonées. Il a été ainsi montré que les domaines s_o sont de taille supérieure à $1\ \mu\text{m}$ et peuvent prendre une grande variété de formes qui dépendent de la nature des lipides. Le diagramme de phase d'un tel mélange lipidique est proposé sur la figure 1.27.

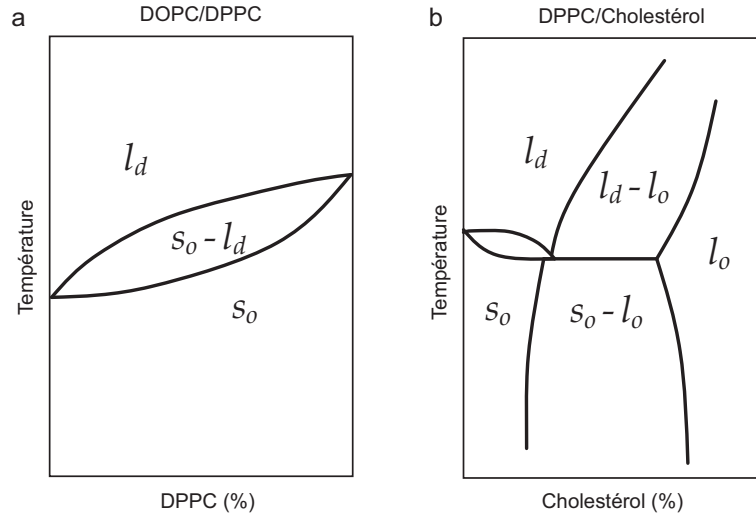


FIG. 1.27 – Allures de diagrammes de phase de mélanges binaires.

a) DOPC/PPC, adapté de [Pencer 04]. b) DPPC/Chol, adapté de [Vist 90]. Il est vraisemblable que des phases solides coexistent dans les mélanges DOPC/PPC en dessous de la température de transition de DOPC.

Mélanges binaires avec du cholestérol

Nous avons étudié l'insertion du cholestérol dans les bicouches de phospholipides dans le paragraphe 1.2.1. En 1990, Vist et Davis déterminent un diagramme de phase partiel pour un mélange binaire DPPC-Chol, grâce à l'utilisation en parallèle des techniques de calorimétrie et de mesure RMN au deutérium. Les mesures de RMN permettent de repérer le spectre des phases s_o , l_d et l_o . Une superposition des spectres s_o et l_o est observée dans les mélanges comportant du DPPC et entre 5 et 25% de cholestérol à basse température ($T < T_m$), ce qui correspond à une coexistence des deux phases s_o et l_o .

À des températures plus élevées ($T > T_m$), les données RMN ne montrent plus une superposition nette des spectres, mais perdent en résolution, ce qui est attribué à des échanges entre les deux environnements lipidiques, avec une constante de

temps de l'ordre de 10 μ s. Si on suppose que les échanges se font par diffusion, cet ordre de grandeur implique une taille de domaines inférieure à 100 nm [Veatch 04]. L'observation par microscopie de fluorescence ne permet d'ailleurs pas l'observation de domaines (la résolution de cette technique est de l'ordre du μ m). À plus haute température et pour de fortes concentrations en cholestérol, la résolution des spectres de RMN est restaurée et la membrane est dans une seule phase uniforme l_d .

Les domaines de taille < 100 nm : de véritables phases thermodynamiques ?

Revenons sur l'utilisation du terme "phase" utilisé parfois pour décrire les domaines observés lors du tracé des diagrammes de phase. Les domaines nanoscopiques mesurés dans [Veatch 04] restent grands à l'échelle de la taille d'un lipide : un domaine de 80 nm pourrait contenir environ 15000 lipides. Néanmoins, ces hétérogénéités sont des entités dynamiques, donc les effets d'interfaces (tension de ligne) ne sont sans doute pas négligeables.

Si, dans les régions du diagramme de phase correspondant à une phase unique, le terme est approprié, il ne l'est pas toujours dans les régions de coexistence. Une phase est en effet définie au sens thermodynamique pour un domaine de taille macroscopique pour lequel l'enthalpie libre par molécule est une constante. Le terme est donc discutable pour décrire un ensemble dispersé de domaines de taille < 100 nm, d'autant plus qu'un tel système est dominé par les fluctuations.

Revenons sur le modèle de couche lipidique constituée de deux types de lipides A et B afin d'évaluer la taille critique permettant d'utiliser le terme de phase. Supposons que la température et la pression sont telles que les lipides se distribuent en deux domaines macroscopiques A et B . Le nombre de molécules à l'interface entre les deux domaines A et B est suffisamment petit pour que l'enthalpie libre de l'interface soit négligeable devant l'enthalpie libre de la surface des domaines, et l'enthalpie libre par molécule est bien constante. Réduisons maintenant la taille des domaines B ; en dessous d'une certaine taille, l'enthalpie libre de l'interface devient non négligeable devant l'enthalpie libre totale, et l'enthalpie libre par molécule n'est plus constante : le domaine ne se comporte plus comme une phase au sens thermodynamique du terme.

Mélanges ternaires avec du cholestérol

Récemment, de nombreuses équipes ont entrepris de travailler sur des systèmes modèles plus complexes : des mélanges ternaires constitués de lipides saturés, de lipides insaturés et de cholestérol (voir l'article de revue [Silvius 03]). Le diagramme de phase de tels mélanges est très riche.

De nombreux systèmes ternaires ont été étudiés. Nous présentons ici succinctement les résultats obtenus sur les deux systèmes DOPC/SM/Chol et DOPC/DPPC/Chol.

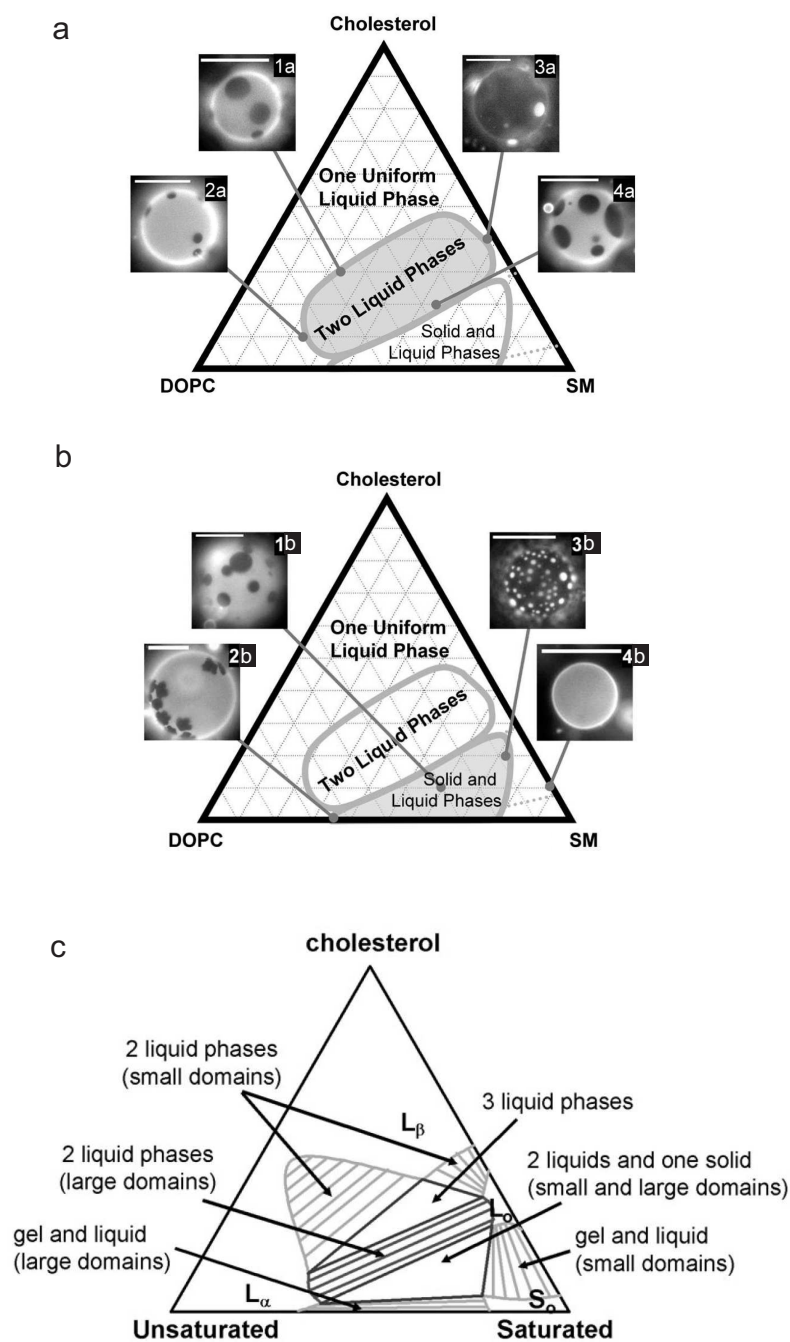


FIG. 1.28 – Allure du diagramme de phase du mélange ternaire DOPC/SM/Chol et images par microscopie de fluorescence de vésicules à 25°C prises en photo avant coalescence complète. Les compositions sont les suivantes :

1a) 2 :1 DOPC/PSM + 30% Chol; 2a) 3 :1 DOPC/PSM + 10% Chol;
 3a) 1 :19 DOPC/PSM + 40% Chol; 4a) 1 :2 DOPC/PSM + 20% Chol;
 1b) 2 :1 DOPC/PSM + 0% Chol; 2b) 1 :2 DOPC/PSM + 10% Chol;
 3b) 1 :9 DOPC/PSM + 20% Chol; 4b) PSM + 10% Chol.

Les barres ont une longueur de 20 μm . D'après [Veatch 02]

Le mélange ternaire DOPC/SM/Chol Le mélange phospholipide/sphingolipide/cholestérol, tel que DOPC/SM/Chol, constitue un système susceptible de modéliser la membrane cellulaire.

En dessous d'une température de miscibilité, on observe une coexistence des phases l_o et l_d [Dietrich 01, Veatch 02]. Ces domaines fluides sont souvent étudiés en tant que modèles des radeaux lipidiques. Les domaines fluides sont circulaires, diffusent librement, ont des frontières fluctuantes et coalescent après collision pour former des domaines plus grands. Après un temps suffisamment long, les bicouches ne comportent plus que deux grandes phases. Il est également possible de déterminer qualitativement la composition des deux phases fluides : une phase est riche en sphingomyéline et en cholestérol, tandis que l'autre phase est riche en phosphatidylcholine insaturée.

On peut remarquer que la coexistence à l'échelle du micron de deux phases fluides n'a pas été observée pour des membranes contenant plus de 50% de cholestérol, ni dans les membranes avec moins de 10% de lipide saturé, ou en l'absence de lipide insaturé.

Le mélange ternaire DOPC/DPPC/Chol Ce mélange possède le même type de diagramme de phase que le mélange précédent. Plusieurs équipes ont montré l'existence de domaines fluides de taille inférieure au micron pour certaines conditions de composition et de température. Ces domaines ne sont pas détectés par microscopie de fluorescence, mais peuvent l'être par RMN [Veatch 03] ou par diffusion de neutrons [Pencer 05]. Veatch *et al.* ont ainsi mesuré la température de transition de miscibilité T_{mix} par RMN ^2H , RMN ^1H et par microscopie de fluorescence. Pour des températures légèrement inférieures à T_{mix} , les expériences de microscopie de fluorescence réalisées sur des GUVs permettent de mesurer des tailles de domaines supérieures à 1 μm , alors que les mesures de RMN réalisées sur des vésicules multilamellaires mesurent des diamètres de domaines de l'ordre de 80 nm. Ce n'est qu'à une température plus basse que la RMN mesure des domaines macroscopiques l_o et l_d de taille très supérieure à 160 nm.

Ces observations pourraient être extrêmement intéressantes puisqu'un tel système pourrait constituer un bon modèle de domaines fluides de taille non macroscopique.

Des membranes modèles aux membranes cellulaires

Les membranes modèles composées de deux à trois espèces lipidiques ne semblent pas suffisantes pour décrire les membranes cellulaires. Il est possible d'améliorer les résultats en travaillant sur des systèmes ayant une architecture plus complexe. Certaines équipes incluent donc des protéines dans une bicouche lipidique [Kahya 01, Bacia 04]. D'autres équipes essaient de mimer l'effet du cytosquelette en construisant un réseau d'actine artificiel [Limozin 03]. Enfin, les GUVs peuvent être créées à partir de matériel biologique prélevé sur une membrane cellulaire lipidique [de la Serna 04], ce qui permet d'intégrer de nombreux types de protéines et de lipides, en proportions physiologiques.

1.5.2 Les radeaux lipidiques existent-ils vraiment ?

Le modèle des radeaux lipidiques a retenu l'attention de nombreux chercheurs depuis une vingtaine d'années. Des réserves sont toutefois encore émises quant à l'existence même des radeaux lipidiques. Ces réserves sont largement liées aux nombreuses difficultés expérimentales rencontrées et sont exposées dans l'article de revue [Munro 03].

Caractérisation biochimique des DRMs

Les radeaux lipidiques n'ont qu'une définition biochimique. Or les problèmes liés à l'utilisation de détergents ont déjà été en partie exposés dans le paragraphe 1.4.3. De nombreux réarrangements membranaires non physiologiques peuvent notamment avoir lieu au cours du processus de solubilisation par le détergent. En effet, la solubilisation par le détergent nécessite que les molécules de détergent s'insèrent dans la bicouche lipidique en quantité suffisante pour induire la formation de trous au sein de la membrane cellulaire. La formation de ces trous pourrait résulter d'un mélange des deux feuillettes au début du processus de solubilisation, impliquant une perturbation importante de la composition lipidique. Même dans le cas où un tel mélange n'aurait pas lieu, il est probable que les feuillettes interne et externe, n'ayant pas la même composition, n'aient pas la même sensibilité au détergent.

L'utilisation de la déplétion en cholestérol

La modulation de la composition en cholestérol de la membrane cellulaire et donc la modification de la sous-structuration en radeaux lipidiques est réalisée, soit grâce à des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol, soit par extraction du cholestérol par la M β CD. L'action de la M β CD sur la membrane pourrait ne pas avoir les effets attendus (à savoir la suppression des radeaux lipidiques). Il a été montré que la déplétion en cholestérol induit la formation de domaines incluant des lipides préférant les phases *liquide désordonné* [Hao 01].

De plus, l'action de la M β CD est non spécifique : non seulement elle enlève du matériel biologique mais en plus celui-ci n'est pas nécessairement du cholestérol. L'équipe de C. Le Grimellec a par ailleurs montré que l'addition de M β CD à des membranes modèles constituées d'un mélange ternaire DOPC/POPC/SM conduisait à la formation de trous, en extrayant préférentiellement de la sphingomyéline, alors que l'addition de M β CD chargée en cholestérol induit la disparition des domaines au profit d'une phase homogène *liquide ordonné* [Giocondi 04]. Tout indique que l'interprétation de l'effet de l'addition de M β CD chargée ou non en cholestérol en terme d'addition ou de soustraction de cholestérol doit être réalisée avec prudence.

Les méthodes à disposition méritent d'être complétées. Nous proposons ici une méthode possédant une grande précision temporelle, permettant de travailler sur cellules vivantes. Pour cela, nous utiliserons une méthode d'étude de la diffusion membranaire, qui doit pouvoir mettre en évidence une compartimentalisation.

Chapitre 2

Un outil d'étude de la diffusion utilisable dans les milieux biologiques : la Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS)

Sommaire

2.1	La fluorescence	59
2.1.1	Principe de la fluorescence	59
	Quantification de l'énergie d'une molécule	59
	Excitation de la molécule fluorescente	60
	Désexcitation de la molécule fluorescente	60
2.1.2	Propriétés des fluorophores	62
	Le rendement quantique	63
	Le coefficient d'extinction	63
	La durée de vie de fluorescence	63
	La polarisation	63
	La photostabilité	64
2.1.3	Les marqueurs fluorescents	64
	Les analogues lipidiques fluorescents	64
	Les protéines de fusion et la transfection transitoire	65
2.2	Principe de la FCS et calcul théorique de l'ACF	68
2.2.1	Corrélation des fluctuations de concentration	68
2.2.2	La fonction de corrélation des fluctuations de photocourant	71
2.2.3	Expression de la fonction d'autocorrélation correspondant à la diffusion translationnelle	73
	Expression de la fonction d'autocorrélation correspondant à des molécules fluorescentes diffusant librement dans les trois dimensions	74

	Expression de la fonction d'autocorrélation correspondant à des molécules fluorescentes diffusant librement dans une surface à deux dimensions	74
2.2.4	Aspects photophysiques des mesures de FCS : état triplet et ACF	75
2.2.5	Modification de la valeur de $g^{(2)}(0)$: le temps mort du détecteur	77
2.2.6	Facteur de correction pour le bruit de fond	78
2.2.7	Forme générale d'une ACF pour une espèce de molécules	78
2.2.8	Cas de plusieurs espèces	78
2.3	Montage utilisé	79
2.3.1	Description du montage	79
2.3.2	Le filtrage spectral	81
2.3.3	Le filtrage spatial	82
2.4	Avantages de la FCS	84
2.5	Les applications de la FCS	85
2.5.1	Les applications de la FCS en solution	85
	Réactions conduisant à un changement des propriétés de diffusion	85
	Réactions conduisant à un changement de brillance	85
	Mesure d'un taux de réaction par FCCS	85
2.5.2	Les applications de la FCS pour l'étude de la diffusion mem- branaire	88
	Utilisation de la FCS pour l'étude des membranes modèles	88
	La diffusion anormale	89
2.6	Les difficultés liées à l'utilisation de la FCS	90
2.6.1	Le contrôle du photoblanchiment	90
2.6.2	Mesure de la taille du volume confocal	90
2.6.3	Choix de l'ajustement de l'ACF	90

Il existe deux façons d'accéder aux grandeurs caractéristiques de phénomènes statistiques. Dans les méthodes de relaxation classiques, des perturbations externes telles que des variations de température ou de pression sont imposées à un système et l'étude du retour à l'état d'équilibre fournit des informations sur les paramètres cinétiques impliqués. L'autre méthode utilise les fluctuations existant même lorsque le système est à l'équilibre.

La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS, pour *Fluorescence Correlation Spectroscopy*) a été conçue en 1972 par Magde, Elson et Webb [Magde 72], à une époque où la méthode de mesure des fluctuations est largement utilisée, notamment pour étudier les phénomènes statistiques tels que la dynamique des transitions de phase, les phénomènes critiques et les superfluides. La spectroscopie de corrélation de fluctuations utilisant des signaux électriques, magnétiques ou de température permettait par exemple d'étudier les fluctuations quantiques dans les supraconducteurs. Il existait également une technique optique d'analyse des fluctuations : la diffusion

quasi-élastique de lumière analyse les interférences produites par la lumière d'un laser diffusée par les particules d'intérêt. Cette méthode est particulièrement adaptée à l'étude du transport moléculaire lorsque le milieu d'étude est relativement concentré et que les espèces suivies possèdent un indice de réfraction suffisamment différent de celui du milieu dans lequel elles diffusent. Cette technique ne convient ni à l'étude de la progression des réactions chimiques, puisque la polarisabilité ne change que très peu avec la modification de la structure moléculaire, ni à l'étude de la diffusion d'une espèce très diluée.

Afin de surmonter ces limitations, Elson et Magde proposent une nouvelle méthode expérimentale, reposant sur les mesures de fluctuations de fluorescence : la FCS. La fluorescence permet en effet de réaliser des mesures de très grande sensibilité et spécifiques d'une espèce donnée. En 1976, Koppel montre que le rapport signal sur bruit des mesures FCS ne dépend pas du nombre de photons mesurés par unité de temps mais du nombre de photons par unité de temps et par molécule fluorescente. Il améliore alors notablement le rapport signal sur bruit du montage initial de Elson et Magde (qui nécessitait des temps d'intégration de plusieurs heures), en introduisant l'utilisation du microscope confocal [Koppel 76].

2.1 La fluorescence

Lors des phénomènes de luminescence, les molécules émettent de la lumière après être passées dans un état électronique supérieur sous l'effet d'une excitation créée par un mécanisme physique (par exemple, l'absorption de lumière), mécanique (un frottement) ou chimique. Lorsque l'excitation est due à l'absorption d'un photon de longueur d'onde appartenant au spectre visible ou ultraviolet, la génération de luminescence est appelée photoluminescence. Il existe deux catégories de photoluminescence, distinguables par leurs voies de désexcitation : la fluorescence et la phosphorescence. La phosphorescence est caractérisée par une désexcitation beaucoup plus lente que la fluorescence.

2.1.1 Principe de la fluorescence

Quantification de l'énergie d'une molécule

Dans l'approximation de Born-Oppenheimer, l'énergie totale d'une molécule est la somme de son énergie électronique, de son énergie de rotation et de son énergie de vibration, toutes ces énergies étant quantifiées (figure 2.1).

- Les transitions entre niveaux rotationnels ont une énergie de l'ordre de 10^{-3} eV (domaines des micro-ondes) pour des molécules hétéropolaires.
- Les transitions entre niveaux vibrationnels ont une énergie de l'ordre de 10^{-1} eV (domaine des infra-rouges) pour des molécules hétéropolaires.
- Les transitions entre niveaux électroniques ont une énergie de l'ordre de 1 eV (domaine visible) à 10 eV (domaine des ultra-violets)

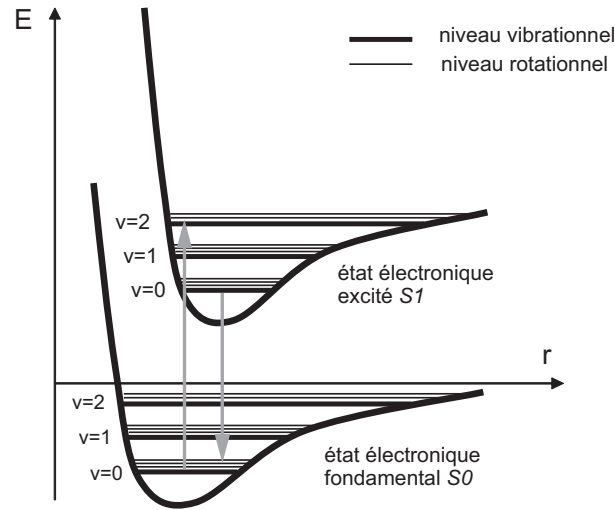


FIG. 2.1 – Niveaux d'énergie d'une molécule diatomique.
 r est la distance internucléaire. Les transitions radiatives correspondant à l'absorption et à l'émission de fluorescence sont représentées. Les transitions sont suffisamment rapides pour que r puisse être considéré comme constant : les transitions sont donc verticales (principe de Franck-Condon).

Excitation de la molécule fluorescente

Dans des conditions normales, le niveau d'énergie est le niveau fondamental, noté S_0 . Sachant que la valeur de $k_B T$ est de 0,026 eV à température ambiante, les niveaux rotationnels sont peuplés, mais seul le niveau fondamental électronique et vibrationnel est peuplé (l'état quantique de la molécule est noté : $|S_0, v=0\rangle$). Lorsqu'une quantité appropriée d'énergie électromagnétique est fournie à une molécule, cette molécule peut passer de l'état fondamental S_0 à un état excité supérieur S_1 (que l'on notera $|S_1, v'\rangle$ lorsqu'on aura besoin de mentionner le niveau vibrationnel) ou S_2 (figure 2.1). L'excitation lumineuse peut être induite par un seul photon (absorption monophotonique) ou par l'interaction simultanée de deux (ou trois) photons dont la somme des énergies est égale à l'écart d'énergie entre les deux états S_1 et S_0 (absorption à deux photons ou à trois photons). Le temps nécessaire à l'absorption est très court (de l'ordre de 10^{-15} s).

Lors de l'absorption, une règle de sélection impose $v' \neq v$, mais toutes les transitions $|S_0, v=0\rangle \rightarrow |S_1, v' \neq 0\rangle$ sont autorisées. Il existe donc toute une série de longueurs d'onde permettant de promouvoir l'électron dans l'état S_1 .

Désexcitation de la molécule fluorescente

L'émission de lumière, c'est-à-dire le processus radiatif inverse à l'absorption, s'effectue souvent à partir du premier niveau vibrationnel contenu dans l'état excité de plus basse énergie ($|S_1, v'=0\rangle$), tel que stipulé par la règle de Kasha. Avant l'émission d'un photon, la molécule doit donc d'abord réaliser la transition

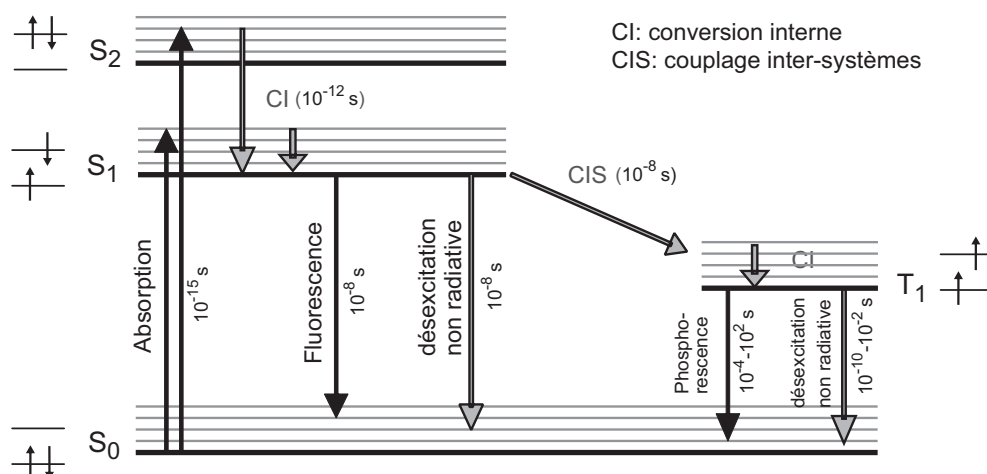


FIG. 2.2 – Diagramme de Jablonski.

Les lignes horizontales représentent les niveaux d'énergie (les niveaux d'énergie rotationnels ne sont pas indiqués). S : état singulet ; T : état triplet ; les indices 0, 1 et 2 représentent respectivement l'état fondamental, le premier et le second niveau d'énergie. Les lignes verticales représentent les transitions entre les différents niveaux d'énergie : les lignes droites correspondent à des transitions radiatives ; les lignes courbes correspondent à des transitions non radiatives (CIS : couplage inter-systèmes, CI : conversion interne). L'excitation vers l'état S_2 est possible, mais il y a relaxation vers S_1 avant émission de fluorescence.

$|S_1, v' \neq 0\rangle \rightarrow |S_1, v' = 0\rangle$. Cette perte d'énergie vibrationnelle excédentaire est réalisée de façon non radiative.

La même règle de sélection que lors de l'absorption impose un changement de nombre quantique de vibration ($\Delta v \neq 0$) : toute une série de longueurs d'ondes vont donc pouvoir être émises. On appelle raies Stokes les raies d'émission telles que $\Delta v = 1$ et raies anti-Stokes les raies telles que $\Delta v = -1$. La durée de vie de l'état excité est de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} s.

La molécule peut retrouver son état fondamental après d'autres phénomènes. Ce retour peut se faire par étapes successives, après passage pendant un certain temps dans des niveaux d'énergie intermédiaire :

- Ainsi, une molécule excitée à un niveau élevé (état S_2 ou supérieur) est rapidement désexcitée en suivant un processus non radiatif (conversion interne) et atteint l'état excité métastable S_1 . Une conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$ peut avoir lieu rapidement, mais dans le cas des molécules fluorescentes elle est suffisamment lente pour que la désexcitation par émission de lumière puisse avoir lieu avec une grande probabilité.
- La fluorescence est aussi en compétition avec le couplage inter-système $S_1 \rightarrow T_1$. Cette transition non radiative est accompagnée d'un changement de spin d'un électron de la molécule. L'émission de lumière accompagnant la transition $T_1 \rightarrow S_0$ est par conséquent peu probable et donc lente (il s'agit du phénomène de phosphorescence). Signalons que la probabilité de la transition $S_1 \rightarrow T_1$ est

plus faible d'au moins un ordre de grandeur que la probabilité de la transition radiative $S_1 \rightarrow S_0$.

- La molécule peut également revenir dans son état fondamental sans émission de photons. En effet, si l'on ajoute dans la solution contenant le fluorophore des molécules qui peuvent entrer en collision avec les molécules fluorescentes ou des molécules capables de former avec elles des complexes qui n'émettent pas de radiation lumineuse, d'autres voies de désexcitation vont pouvoir se produire. Ces deux types de molécules vont jouer le rôle de *quenchers* de la molécule fluorescente : lors des collisions intermoléculaires, l'énergie électronique sera convertie en énergie cinétique et de vibrations, c'est le *quenching dynamique*. Le *quenching statique* est observé lors de la formation de complexes non fluorescents. Dans les deux cas, la fluorescence sera faible, voire non détectable.

Chaque molécule peut être caractérisée par ses spectres d'absorption et d'émission, qui reflètent la distribution de probabilités des transitions énergétiques. Ils sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules. Comme nous l'avons vu, une partie seulement de l'énergie absorbée peut être émise sous forme de rayonnement (ainsi la longueur d'onde du maximum d'émission est supérieure à celle du maximum d'excitation : c'est le décalage de Stokes). Le spectre d'absorption est caractéristique d'une molécule dans un environnement donné et le spectre d'excitation de son éventuel centre fluorescent lui est très généralement identique. Le spectre d'émission de fluorescence est approximativement une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption (figure 2.3).

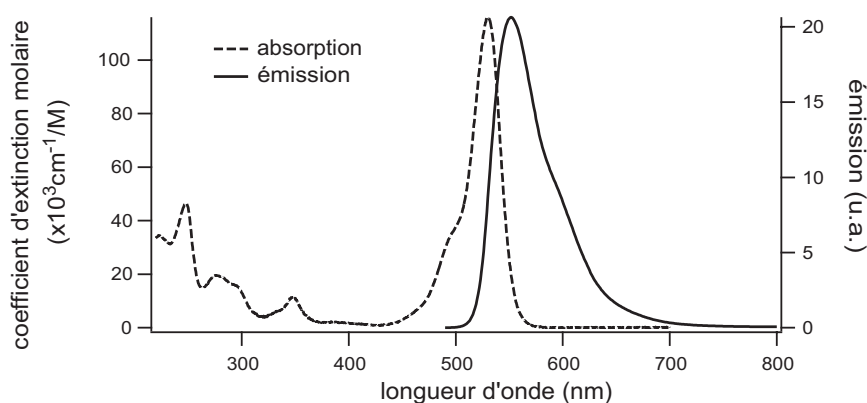


FIG. 2.3 – Spectres d'absorption et d'émission de la Rhodamine 6G.

Le décalage en longueur d'onde entre les maxima d'absorption et d'émission est appelé décalage de Stokes. D'après [Du 98] et : <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/>

2.1.2 Propriétés des fluorophores

Dans cette section, nous définirons et expliciterons les caractéristiques importantes de l'émission de fluorescence.

Le rendement quantique

L'efficacité de l'émission de lumière fluorescente pour une molécule donnée est déterminée par le rendement quantique de fluorescence ϕ_f , défini par le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Les fluorophores ont des rendements quantiques compris entre 0,1 et 1.

Le coefficient d'extinction

Le coefficient d'extinction ϵ reflète la probabilité d'absorption de la molécule (il est donc lié à la section efficace d'absorption de la molécule). Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des colorants ; plus ϵ est grand, plus élevée sera l'intensité de la fluorescence, à intensité lumineuse incidente égale.

L'intensité de fluorescence ou brillance d'une sonde est déterminée par le produit du coefficient d'extinction et du rendement quantique. Le tableau 2.1 donne quelques exemples de brillance de certains fluorophores et par comparaison les valeurs obtenues pour des nanocristaux (*Quantum Dots*, nano-particules inorganiques).

TAB. 2.1 – *Brillance de quelques fluorophores. La brillance de deux types de nanocristaux est donnée à titre de comparaison*

		ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	ϕ_f	brillance (u.a.)
	fluorescéine	80000	0,9	72000
	cyanine 5	250000	0,35	90000
	EYFP	84000	0,61	51000
$\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm	nanocristal 605	1000000	0,55	550000
$\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm	nanocristal 655	3000000	0,60	1800000

La durée de vie de fluorescence

La troisième caractéristique importante d'une molécule fluorescente est le temps de déclin ou durée de vie de fluorescence. Elle correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité S_1 . La plupart des fluorophores ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde. Plus ce temps sera court, meilleure sera la sensibilité du fluorophore. En effet, plusieurs excitations successives seront possibles car il repassera rapidement dans son état fondamental.

La polarisation

Les fluorophores absorbent préférentiellement les ondes lumineuses dont la polarisation est parallèle à leur dipôle d'absorption : un faisceau polarisé privilégie une sous-population moléculaire ayant l'orientation favorable. Si les molécules étaient immobiles, leur excitation par une lumière polarisée rectilignement donnerait naissance à une radiation polarisée dans la direction du dipôle d'émission de la molécule.

Puisque les molécules peuvent subir une rotation, la fluorescence émise se dépolarise. Ainsi, l'émission ayant lieu quelques nanosecondes après l'absorption, le degré de polarisation de l'émission fournit un renseignement sur la microviscosité de l'environnement moléculaire. L'anisotropie de fluorescence diminue encore lorsque les fluorophores subissent du FRET. Le temps caractéristique de dépolarisation de l'émission de fluorescence due au FRET est beaucoup plus grand que le temps caractéristique de dépolarisation de l'émission de fluorescence due à la diffusion rotationnelle des fluorophores. Il est donc possible de séparer les deux contributions et d'étudier avec précision la dépolarisation de l'émission de fluorescence due au FRET. Cette technique a été utilisée par l'équipe de S. Mayor, dont les résultats ont été exposés dans la section 1.4.3, pour étudier l'organisation de différentes protéines ancrées GPI dans la membrane cellulaire.

La photostabilité

Le phénomène de photoblanchiment (*photobleaching*) se produit quand un fluorophore perd de façon permanente la capacité de produire des photons de fluorescence en raison de dommages chimiques photoinduits. Après la transition $S_1 \rightarrow T_1$, un fluorophore peut interagir avec une autre molécule pour produire des modifications covalentes non réversibles. L'état triplet a une durée suffisamment longue pour que le fluorophore ait une probabilité non négligeable de s'engager dans une réaction chimique avec une molécule de son environnement. Les fluorophores exposés à de trop nombreux cycles d'excitation et émission perdent donc leur capacité à émettre des photons. Le nombre moyen de cycles avant photoblanchiment dépend de la structure moléculaire du fluorophore ainsi que de son environnement. Certains fluorophores photoblanchissent très rapidement, après émission de seulement quelques photons, alors que d'autres peuvent émettre en moyenne quelques milliers ou millions de photons avant photoblanchiment.

Certains événements de photoblanchiment sont photodynamiques, nécessitant l'action combinée de la lumière et de l'oxygène. La réaction entre le dioxygène et les fluorophores détruit irréversiblement la fluorescence et produit un radical libre qui peut à son tour réagir avec les autres molécules environnantes (ce qui peut être particulièrement néfaste si l'on souhaite travailler sur la cellule vivante). Afin de réduire ce phénomène de photoblanchiment photodynamique, il peut être intéressant de réduire l'intensité d'excitation ; mais cela réduit d'autant le signal de fluorescence mesuré. Il est possible également de désoxygéner le milieu lorsqu'on travaille avec des solutions de fluorophores ; cela n'est pas faisable en revanche lorsqu'on travaille avec des tissus ou des cellules vivantes.

2.1.3 Les marqueurs fluorescents

Les analogues lipidiques fluorescents

Les analogues lipidiques fluorescents sont des lipides auxquels est attaché de façon covalente un fluorophore. Les lipides étant amphiphiles, il existe *a priori* deux régions

de la molécule auxquelles peut être attaché le fluorophore. La localisation intramoléculaire ainsi que la nature chimique du fluorophore déterminent les propriétés biophysiques de l'analogue lipidique fluorescent fabriqué. La majorité des fluorophores utilisés pour réaliser des analogues lipidiques fluorescents sont hydrophiles. S'il sont attachés à la chaîne carbonée, ils modifient alors l'équilibre hydrophobe/hydrophile de la molécule, ce qui est susceptible de perturber la membrane cellulaire lors de l'intégration d'un tel lipide [Ashcroft 80]. Néanmoins, cette catégorie d'analogues fluorescents doit être utilisée lorsque l'étude porte sur des lipides dont le groupe hydrophile peut jouer un rôle fonctionnel. Dans les autres cas, il est souvent préférable de travailler avec des analogues lipidiques dont le fluorophore est greffé au niveau de la tête hydrophile, en particulier lorsque les propriétés de la chaîne carbonée ont une influence importante ; c'est le cas par exemple lorsque l'on souhaite étudier la distribution des lipides au sein des différents domaines de la membrane biologique.

Il est donc important d'avoir conscience lors des différentes expériences qu'un analogue fluorescent n'aura pas nécessairement le même comportement que le lipide qu'il doit imiter. Des expériences préalables doivent permettre de vérifier qu'il s'en approche suffisamment... On peut noter en particulier que le Bodipy est souvent greffé sur une des chaînes carbonées avec une orientation défavorable : il limite alors l'interaction du lipide avec ses voisins : celui-ci ira sans doute moins facilement dans les radeaux lipidiques.

Les analogues lipidiques fluorescents sont incorporés dans la membrane plasmique des cellules par une procédure d'échange lipidique [Pagano 98, Probes 03] : ils sont ajoutés à faible concentration sous forme de complexes avec la BSA (*Bovine Serum Albumine*). La procédure est détaillée dans la section A.2.1 de l'annexe.

Les protéines de fusion et la transfection transitoire

La GFP (*Green Fluorescent Protein*) La GFP (*Green Fluorescent Protein*) est une protéine fluorescente dont la forme sauvage a pu être isolée chez les *coelentérés*, tels que les méduses Pacifiques, *Aequoria Victoria* ou dans la pensée de mer, *Renilla reniformis*. En milieu naturel, la protéine aequorine émet de la lumière bleue par chimiluminescence. Mais cette molécule subit du FRET en présence de GFP qui joue le rôle d'accepteur et émet alors de la lumière verte.

Le gène codant pour la GFP a pu être isolé et permet de fabriquer des protéines chimériques : la GFP est liée à d'autres protéines et joue le rôle d'étiquette fluorescente. Il est en effet possible de fusionner la GFP par l'intermédiaire de son extrémité -N ou -C à une grande variété de protéines.

La GFP a été décrite pour la première fois en 1962. Elle est constituée de 238 acides aminés. Le chromophore (centre actif responsable de la fluorescence) est constitué par les chaînes latérales d'une glycine, une tyrosine et une sérine. La GFP non modifiée, dite sauvage (*wild type*) possède deux maxima d'excitation. Le premier se trouve avec une longueur d'onde de 395 nm (lumière UV), le deuxième à 475 nm (lumière bleue). La longueur d'onde d'émission maximale est à 504 nm.

Il existe maintenant différents variants de la GFP qui sont, soit obtenus en mo-

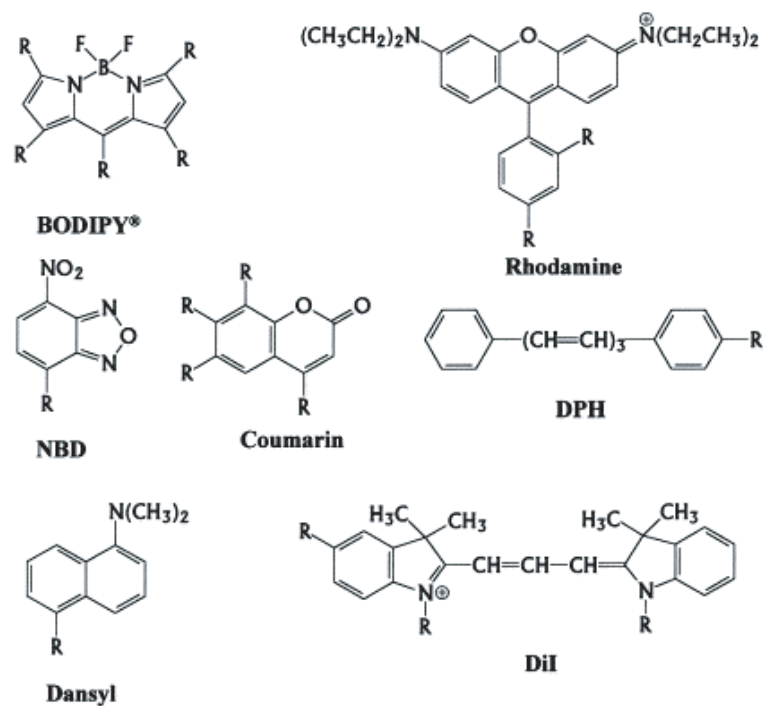


FIG. 2.4 – Exemples de fluorophores utilisés pour la fabrication d'analogues lipidiques fluorescents. Figure adaptée de [Maier 02]

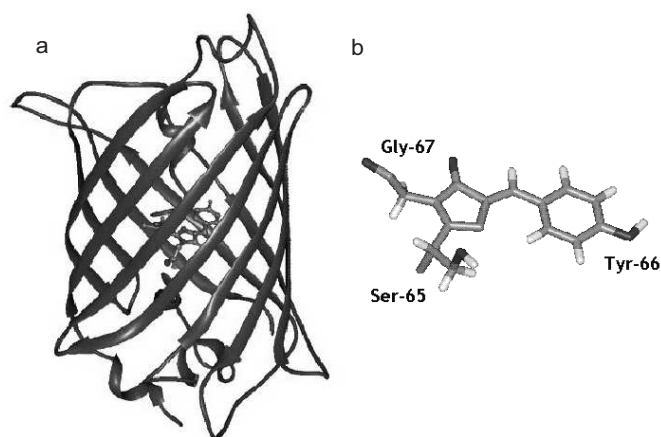


FIG. 2.5 – La Green Fluorescent Protein.
a) Structure moléculaire de la GFP. b) Chromophore de la GFP

difiant celle-ci par ingénierie génétique, soit issus d'autres organismes que *Aequorea Victoria* qui permettent notamment de n'avoir qu'un pic d'émission :

- eGFP (*enhanced GFP*) a une intensité de fluorescence plus grande que celle de la GFP et son pic d'excitation est décalé à 490 nm, alors que son pic d'émission est toujours à 509 nm.
- CFP (*Cyan fluorescent protein*) possède une fluorescence bleu-verte,
- YFP (*Yellow fluorescent protein*) possède une fluorescence jaune.

Un des intérêts majeurs de cette protéine fluorescente est sa non-toxicité pour les cellules vivantes.

La transfection transitoire Nous avons utilisé des protéines fusionnées à la GFP comme des sondes fluorescentes de la membrane plasmique. Les cellules en culture sont transfectées de façon transitoire [Carey 00] avec le plasmide codant pour la protéine de fusion, préalablement mélangée avec l'agent de transfection *Exgen-500*. Celui-ci forme en effet un complexe avec l'ADN codant pour la protéine de fusion ; ce complexe est absorbé par endocytose. La cellule produit alors elle-même les protéines fluorescentes qui sont ensuite adressées à la membrane plasmique. Habituellement, une région de contrôle de la transcription (promoteur ou région stimulatrice) est insérée devant un gène rapporteur – dont on peut facilement et précisément mesurer les niveaux d'ARNm ou de protéines produits – à l'intérieur d'un plasmide. Ce type de transfection est appelé transitoire car le plasmide s'incorpore rarement dans le génome et donc se dégrade rapidement et se dilue à mesure que les cellules se divisent. Ainsi, la mesure du niveau des produits de la transcription doit se faire dans les trois jours suivant la transfection, idéalement la journée suivante. La procédure est détaillée dans la section A.2.2 de l'annexe.

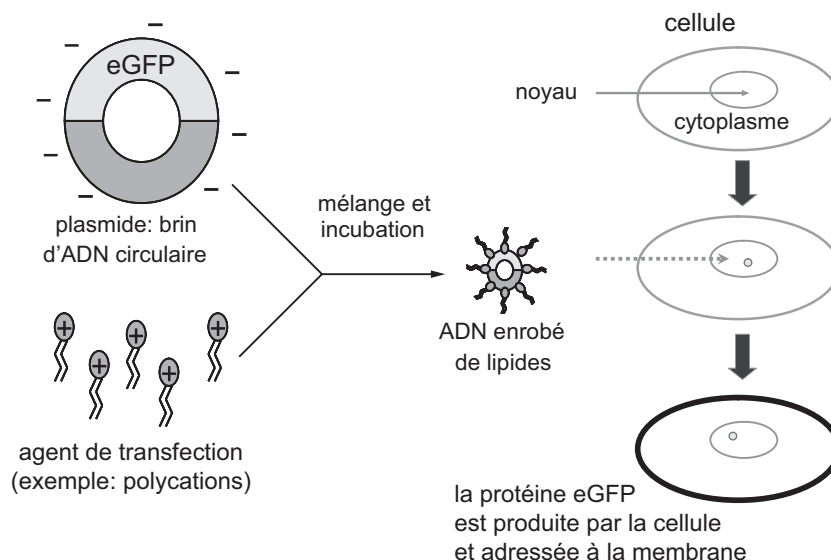


FIG. 2.6 – Principe de la transfection. Figure adaptée de [Sergé 05]

2.2 Principe de la FCS et calcul théorique de la fonction d'autocorrélation

La FCS est l'une des nombreuses méthodes à notre disposition pour réaliser une étude de molécules dans un milieu très peu concentré, avec une grande résolution spatio-temporelle. Contrairement aux autres techniques de fluorescence, ce n'est pas l'étude de l'intensité de la fluorescence émise par les molécules d'intérêt qui est réalisée, mais l'étude des fluctuations d'intensité à l'état d'équilibre.

Lorsque l'on compare la FCS et le FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), on retrouve la distinction entre les deux types d'expériences évoqués dans l'introduction de ce chapitre : la mesure de FRAP est une mesure de retour à l'équilibre, tandis que la FCS est une mesure qui s'effectue à l'équilibre.

Les fluctuations d'intensité de fluorescence existent en permanence à température ambiante, même lorsque le système est à l'état d'équilibre ; l'amplitude et le temps caractéristique de ces fluctuations peuvent être évalués en construisant la fonction d'autocorrélation temporelle. Cette méthode d'analyse fournit une mesure de l'autosimilarité d'un signal temporel et donc de la persistance de l'information qu'il contient.

La fonction d'autocorrélation (ACF, pour Autocorrelation Function) est obtenue à partir du signal d'intensité électrique provenant d'un détecteur mesurant l'intensité de fluorescence. Nous verrons que l'autocorrélation du courant électrique est une image directe des fluctuations d'intensité de fluorescence et donc en particulier des fluctuations de concentration de fluorophores dans le volume confocal.

Dans tous les calculs suivants, nous noterons \bar{A} la moyenne temporelle et spatiale d'une grandeur A et $\langle A(\vec{r}, t) \rangle$ sa moyenne d'ensemble. Dans le cas où le système satisfait les conditions d'ergodicité, on aura $\bar{A} = \langle A(\vec{r}, t) \rangle$.

2.2.1 Corrélation des fluctuations de concentration

Considérons pour commencer une seule espèce de fluorophores en solution et notons $C(\vec{r}, t)$ sa concentration à l'instant t et à la position \vec{r} . Nous pouvons alors définir la variation de concentration par rapport à sa valeur moyenne \bar{C} :

$$\delta C(\vec{r}, t) = C(\vec{r}, t) - \bar{C} . \quad (2.1)$$

Cette valeur moyenne \bar{C} est aussi bien une moyenne temporelle qu'une moyenne spatiale.

La fonction de corrélation de concentration compare la fluctuation de concentration $\delta C(\vec{r}, t)$ avec la fluctuation de concentration $\delta C(\vec{r}', t + \tau)$. Elle est notée :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle , \quad (2.2)$$

où $\langle \rangle$ désigne une moyenne d'ensemble. On peut noter que $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$ ne dépend pas de t , ce qui est vrai si le système est stationnaire : alors ses propriétés moyennes sont

indépendantes du temps. On a alors :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle. \quad (2.3)$$

Lorsque les fluctuations de concentration $\delta C(\vec{r}, t)$ et $\delta C(\vec{r}', t + \tau)$ sont décorréélées, on a : $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = 0$. Lorsqu'elles sont corrélées, on a au contraire : $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) > 0$. Par exemple, lorsque le délai τ tend vers l'infini, c'est-à-dire lorsqu'il devient grand devant le temps caractéristique de diffusion, les fluctuations ne sont plus corrélées et donc :

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = 0. \quad (2.4)$$

Pour un délai τ petit devant le temps caractéristique de diffusion τ_D , on a $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau \ll \tau_D) = \phi(\vec{r}, \vec{r}', 0)$, qui ne dépend que des propriétés du système à l'équilibre. En effet, chaque fluorophore ayant une position déterminée, il ne peut y avoir de corrélation que si $\vec{r} = \vec{r}'$. On a donc : $\phi(\vec{r}, \vec{r}', 0) = \langle (\delta C)^2 \rangle \delta(\vec{r} - \vec{r}')$, où δ est la fonction de Dirac. Pour calculer $\langle (\delta C)^2 \rangle$, on utilise le fait que les expériences sont menées avec des solutions très diluées, qui peuvent donc être considérées comme idéales. De ce fait, les molécules étudiées évoluent de façon indépendante. La longueur de corrélation spatiale des fluctuations d'intensité doit donc être très faible. De plus, le nombre de molécules contenues dans le volume confocal à un instant t est donné par une distribution de Poisson ; il en est de même pour la concentration $C(\vec{r}, t)$. Par conséquent, on a $\langle (\delta C)^2 \rangle = \bar{C}$. Donc :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', 0) = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', 0) \rangle = \bar{C} \delta(\vec{r} - \vec{r}'), \quad (2.5)$$

Généralement, si l'on considère N espèces différentes de concentration $C_i(\vec{r}, t)$, avec $i \in \mathbb{N}$, de coefficients de diffusion D_i , l'équation différentielle dirigeant $C_i(\vec{r}, t)$ est :

$$\frac{\partial C_i(\vec{r}, t)}{\partial t} = D_i \Delta C_i(\vec{r}, t) + \sum_{1 \leq j \leq N} T_{ij} C_j(\vec{r}, t) \quad (2.6)$$

où les éléments de la matrice $(T_{ij})_{(i,j) \in \mathbb{N}^2}$ dépendent des taux de réactions chimiques et des concentrations des réactifs. Cette équation ne fait intervenir que des dérivées spatiales ou temporelles de la grandeur $C(\vec{r}, t)$. L'équation sur $\delta C(\vec{r}, t)$ est donc identique.

Si l'on étudie la diffusion d'une espèce unique de fluorophore, l'équation différentielle qui régit $\delta C(\vec{r}, \tau)$ devient alors :

$$\frac{\partial \delta C(\vec{r}, \tau)}{\partial \tau} = D \Delta \delta C(\vec{r}, \tau) \quad (2.7)$$

Afin de résoudre cette équation, passons dans l'espace de Fourier spatial. La fonction $\delta C(\vec{r}, \tau)$ est bien une fonction de L^2 et les conditions aux limites sont les suivantes :

$$\delta C(\vec{r}, \tau) = 0 \quad \text{pour } x = \pm\infty \quad \text{ou } y = \pm\infty \quad \text{ou } z = \pm\infty \quad (2.8)$$

En notant $\delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau)$ la transformée de Fourier de $\delta C(\vec{r}, \tau)$, les définitions pour la transformée de Fourier et la transformée de Fourier inverses sont respectivement :

$$F_{\vec{k}}(\delta C(\vec{r}, \tau)) = \delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau) = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int_{\mathbb{R}^3} \delta C(\vec{r}', \tau) \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}') d^3 r' \quad (2.9)$$

$$F_{\vec{r}}^{-1}(\delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau)) = \delta C(\vec{r}, \tau) = \frac{1}{(2\pi)^{3/2}} \int_{\mathbb{R}^3} \delta\tilde{C}(\vec{k}', \tau) \exp(i\vec{k}' \cdot \vec{r}) d^3 k' \quad (2.10)$$

On a alors :

$$\begin{aligned} \phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle \\ &= \left\langle \delta C(\vec{r}, 0) F_{\vec{r}'}^{-1}(\delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau)) \right\rangle \end{aligned} \quad (2.11)$$

Il est possible d'échanger l'ordre des calculs de la moyenne d'ensemble et de la transformée de Fourier inverse, ces opérations étant linéaires. L'équation (2.11) devient alors :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = F_{\vec{r}}^{-1} \left\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau) \right\rangle \quad (2.12)$$

Or dans l'espace de Fourier, l'équation différentielle (2.7) devient :

$$\frac{\partial \delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau)}{\partial \tau} = -D k^2 \delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau). \quad (2.13)$$

La solution de cette équation différentielle temporelle du premier ordre est obtenue aisément et a pour expression :

$$\delta\tilde{C}(\vec{k}, \tau) = \delta\tilde{C}(\vec{k}, 0) \exp(-D k^2 \tau) \quad (2.14)$$

En utilisant l'équation (2.14) dans l'équation (2.11), on a alors :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = F_{\vec{r}'}^{-1} \left\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta\tilde{C}(\vec{k}, 0) \exp(-D k^2 \tau) \right\rangle. \quad (2.15)$$

De plus, $\delta\tilde{C}(\vec{k}, 0)$ est la transformée de Fourier de $\delta C(\vec{r}, 0)$. On a donc $\delta\tilde{C}(\vec{k}, 0) = F_{\vec{k}}(\delta C(\vec{r}, 0))$. Par conséquent, l'équation (2.15) peut être écrite sous la forme :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = F_{\vec{r}'}^{-1} \left[\exp(-D k^2 \tau) F_{\vec{k}} \left\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', 0) \right\rangle \right]. \quad (2.16)$$

En utilisant l'équation (2.5), on obtient alors :

$$\begin{aligned} \phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= \overline{C} F_{\vec{r}'}^{-1} \left[\exp(-D k^2 \tau) F_{\vec{k}} \left(\delta(\vec{r} - \vec{r}') \right) \right] \\ &= \frac{\overline{C}}{(2\pi)^{3/2}} F_{\vec{r}'}^{-1} \left[\exp(-D k^2 \tau) \int_{\mathbb{R}^3} \delta(\vec{r} - \vec{r}') \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}) d^3 r' \right] \\ &= \frac{\overline{C}}{(2\pi)^{3/2}} F_{\vec{r}'}^{-1} \left[\exp(-D k^2 \tau) \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}') \right]. \end{aligned} \quad (2.17)$$

Il est de nouveau possible d'échanger l'ordre du calcul de la moyenne d'ensemble et de la transformée de Fourier, ce qui permet d'écrire :

$$\begin{aligned}\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) &= \frac{\bar{C}}{(2\pi)^{3/2}} F_{\vec{r}'}^{-1} \left[\exp(-Dk^2\tau) \exp(-i\vec{k} \cdot \vec{r}') \right] \\ &= \frac{\bar{C}}{(2\pi)^{3/2}} \int_{\mathbb{R}^3} \exp(-Dk^2\tau) \exp(i\vec{k} \cdot (\vec{r} - \vec{r}')) d^3\vec{k}. \quad (2.18)\end{aligned}$$

Il s'agit alors seulement de calculer la transformée de Fourier d'une gaussienne, ce qui conduit à l'expression suivante pour la corrélation des fluctuations de concentration :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \frac{\bar{C}}{(4\pi D\tau)^{3/2}} \exp \left[-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau} \right] \quad (2.19)$$

L'expression de la corrélation des fluctuations de concentration a été calculée ici pour une diffusion de particules dans les trois dimensions. Dans le cas plus générale d'une diffusion dans n dimensions ($n \in \{1, 2, 3\}$), les intégrales sur \mathbb{R}^3 sont remplacées par des intégrales sur \mathbb{R}^n . La corrélation $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$ devient alors :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \frac{\bar{C}}{(4\pi D\tau)^{n/2}} \exp \left[-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau} \right] \quad (2.20)$$

2.2.2 La fonction de corrélation des fluctuations de photocourant

Dans notre montage, les fluctuations de concentration sont accessibles par la mesure des fluctuations du photocourant mesuré en sortie des photodiodes à avalanches, qui comptent le nombre de photons de fluorescence émis par les molécules d'intérêt traversant le volume confocal.

En faisant l'hypothèse d'une puissance d'excitation constante, les fluctuations du photocourant délivré par le détecteur sont définies comme les déviations par rapport à la moyenne temporelle du signal :

$$\delta i(t) = i(t) - \bar{i}, \quad (2.21)$$

où \bar{i} est la moyenne temporelle de ce photocourant.

Si toutes les fluctuations de fluorescence ne sont liées qu'à des changements de concentration local $\delta C(\vec{r}, t)$ à l'intérieur du volume confocal, les variations de fluctuation du photocourant peuvent être écrites de la façon suivante :

$$\delta i(t) = \kappa \int_{\mathbb{R}^3} I_{exc}(\vec{r}) CEF(\vec{r}) \sigma q \delta C(\vec{r}, t) d^3\vec{r}, \quad (2.22)$$

avec :

κ	efficacité de détection du système global (le rendement quantique des détecteurs est pris en compte dans κ)
$I_{exc}(\vec{r})$	distribution spatiales de l'intensité d'excitation au niveau du plan focal objet de l'objectif de microscope
$CEF(\vec{r})$	fonction d'efficacité de collection (sans dimension)
σ	section efficace d'absorption moléculaire de fluorophore
q	rendement quantique du fluorophore

Le nombre de photons absorbés par une molécule fluorescente de section efficace d'absorption σ est en effet proportionnel à $\sigma I_{exc}(\vec{r})$, où le profil d'excitation dans le plan focal $I_{exc}(\vec{r})$ dépend de la fonction de transfert de l'objectif et du profil du faisceau laser à l'entrée de l'objectif. Si le rendement quantique de ce fluorophore est q , le nombre de photons de fluorescence émis par cette même molécule est donc proportionnel à $\sigma q I_{exc}(\vec{r})$. Les photons de fluorescence sont collectés par l'objectif de microscope et passent par le trou confocal avant d'atteindre le détecteur. Le nombre de photons émis par une molécule et arrivant sur les détecteurs est alors proportionnel à $\sigma q I_{exc}(\vec{r})$. Il suffit alors d'intégrer sur tout l'espace pour obtenir l'intensité de la fluorescence atteignant les détecteurs.

Il est possible de regrouper les différents termes de l'équation (2.22), afin de faire apparaître la fonction d'efficacité de détection moléculaire (*MDE*, pour *Molecular Detection Efficiency*), définie par :

$$MDE(\vec{r}) = I_{exc}(\vec{r}) \cdot CEF(\vec{r}) . \quad (2.23)$$

Elle prend en compte d'une part le profil d'excitation $I_{exc}(\vec{r})$ et d'autre part le profil du volume de collection décrit par la fonction de transfert optique du système $CEF(\vec{r})$. La *MDE* décrit la distribution spatiale de la fluorescence. On peut noter que la taille du volume confocal est définie à partir du profil de la *MDE* : le volume effectif pour la FCS s'écrit en effet :

$$V_{\text{eff}} = \frac{\left[\int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) d^3\vec{r} \right]^2}{\int_{\mathbb{R}^3} \left[MDE(\vec{r}) \right]^2 d^3\vec{r}} . \quad (2.24)$$

D'autre part, en posant $\eta = \kappa \sigma q$, l'équation (2.22) devient :

$$\delta i(t) = \eta \int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) \delta C(\vec{r}, t) d^3\vec{r} . \quad (2.25)$$

Nous pouvons alors calculer l'autocorrélation du photocourant :

$$\begin{aligned} \langle \delta i(0) \delta i(\tau) \rangle &= \eta^2 \int_{\mathbb{R}^3} \int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') \left\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \right\rangle d^3\vec{r} d^3\vec{r}' \\ &= \eta^2 \int_{\mathbb{R}^3} \int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') \phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) d^3\vec{r} d^3\vec{r}' . \end{aligned} \quad (2.26)$$

La fonction d'autocorrélation normalisée du photocourant $g^{(2)}(\tau)$ est définie par :

$$\begin{aligned}
 g^{(2)}(\tau) &= \frac{\langle i(t) i(t+\tau) \rangle}{\langle i(t) \rangle^2} \\
 &= 1 + \frac{\langle \delta i(t) \delta i(t+\tau) \rangle}{\langle i(t) \rangle^2} \\
 &= 1 + G(\tau) \\
 &= 1 + \frac{\eta^2 \int_{\mathbb{R}^3} \int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') \phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) d^3\vec{r} d^3\vec{r}'}{\left[\overline{C} \int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) d^3\vec{r} \right]^2} \quad (2.27)
 \end{aligned}$$

où $G(\tau)$ est appelée partie subunitaire de la fonction d'autocorrélation normalisée.

Les fluctuations de photocourant sont décorréliées lorsque le délai τ devient grand devant le temps caractéristique de diffusion. On a alors, en utilisant l'équation 2.4 :

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} G(\tau) = 0 \quad \text{et} \quad \lim_{\tau \rightarrow \infty} g^{(2)}(\tau) = 1. \quad (2.28)$$

D'autre part, en supposant l'ergodicité du photocourant, on a $\langle i(t) \rangle = \bar{i}$ et donc :

$$\langle i(t) \rangle = \bar{i} = \eta \overline{C} \int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) d^3\vec{r}. \quad (2.29)$$

Donc lorsque le délai τ est petit devant le temps caractéristique de diffusion, les fluctuations de photocourant sont au contraire corrélées et on a, en utilisant l'équation 2.5 :

$$\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau \ll \tau_D) = \overline{C} \delta(\vec{r} - \vec{r}') \quad (2.30)$$

et donc :

$$g^{(2)}(0) = 1 + \frac{\langle \delta i(t)^2 \rangle}{\langle i(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\eta^2 \overline{C} \int_{\mathbb{R}^3} [MDE(\vec{r})]^2 d^3\vec{r}}{\eta^2 \overline{C}^2 \left[\int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) d^3\vec{r} \right]^2} = 1 + \frac{1}{\overline{C} V_{\text{eff}}}. \quad (2.31)$$

Or si \overline{C} est la moyenne spatiale et temporelle de la concentration de molécules de l'espèce d'intérêt et V_{eff} est la taille du volume confocal, c'est-à-dire la taille du volume effectif d'analyse des fluctuations de concentration, alors $N = \overline{C} V_{\text{eff}}$, avec N le nombre moyen de molécules fluorescentes dans le volume confocal. Alors on a :

$$g^{(2)}(0) = 1 + \frac{1}{N} \quad (2.32)$$

2.2.3 Expression de la fonction d'autocorrélation correspondant à la diffusion translationnelle

Afin d'aller plus loin dans le calcul de l'expression analytique de $g^{(2)}(\tau)$, il est nécessaire de faire plusieurs hypothèses :

- sur le mode de diffusion des molécules
- sur la forme du volume confocal, c'est-à-dire sur l'expression de $MDE(\vec{r})$.

Expression de la fonction d'autocorrélation correspondant à des molécules fluorescentes diffusant librement dans les trois dimensions

Considérons d'abord que les fluorophores diffusent librement dans les trois dimensions. En introduisant dans l'équation (2.27) l'expression correspondante de $\phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$ donnée par l'équation (2.19), on obtient alors :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{\overline{C}(4\pi D\tau)^{3/2}} \frac{\int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau}\right) d^3\vec{r} d^3\vec{r}'}{\left[\int_{\mathbb{R}^3} MDE(\vec{r}) d^3\vec{r}\right]^2} \quad (2.33)$$

Généralement, on considère que la MDE a un profil transversal gaussien. De plus, le profil axial de la MDE est une lorentzienne ; néanmoins, il peut être bien approché par une gaussienne, comme le montre [Rigler 93]. On a alors :

$$MDE(\vec{r}) = M_0 \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{w_z^2}\right) \quad (2.34)$$

On peut alors calculer l'expression analytique de la taille du volume confocal, à partir de l'équation (2.24) :

$$\begin{aligned} V_{\text{eff}} &= \frac{\left[\int_{\mathbb{R}^3} \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{w_z^2}\right) d^3\vec{r}\right]^2}{\int_{\mathbb{R}^3} \exp\left(-4\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2}\right) \exp\left(-4\frac{z^2}{w_z^2}\right) d^3\vec{r}} \\ &= \pi^{3/2} w_{xy}^2 w_z. \end{aligned} \quad (2.35)$$

En définissant le temps de diffusion latéral τ_D dans le volume confocal par $\tau_D = w_{xy}^2 / (4D)$ et s le paramètre de structure par $s = w_{xy}/w_z$, il est possible d'écrire :

$$\begin{aligned} g^{(2)}(\tau) &= 1 + \frac{1}{\overline{C} V_{\text{eff}}} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \\ &= 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \end{aligned} \quad (2.36)$$

Expression de la fonction d'autocorrélation correspondant à des molécules fluorescentes diffusant librement dans une surface à deux dimensions

Dans le cas où les molécules fluorescentes diffusent dans le plan transverse (xy), toutes les intégrales sur \mathbb{R}^3 doivent être remplacées par des intégrales sur \mathbb{R}^2 . De même, le volume effectif de détection V_{eff} doit être remplacé par la surface S_{eff} de

l'intersection entre le volume V_{eff} et le plan dans lequel diffusent les molécules :

$$MDE(\vec{r}) = M_0 \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2}\right) \quad (2.37)$$

$$N = S_{\text{eff}} \bar{C} = \bar{C} \frac{\left[\int_{\mathbb{R}^2} \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2}\right) d^3\vec{r}\right]^2}{\int_{\mathbb{R}^2} \exp\left(-4\frac{x^2 + y^2}{w_{xy}^2}\right) d^3\vec{r}} = \bar{C} \pi w_{xy}^2 \quad (2.38)$$

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{\bar{C}(4\pi D\tau)} \frac{\int_{\mathbb{R}^2} \int_{\mathbb{R}^2} MDE(\vec{r}) MDE(\vec{r}') \exp\left(-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4D\tau}\right) d^2\vec{r} d^2\vec{r}'}{\left[\int_{\mathbb{R}^2} MDE(\vec{r}) d^2\vec{r}\right]^2} \quad (2.39)$$

L'expression de la fonction d'autocorrélation dans le cas d'une diffusion 2D des molécules fluorescentes est donc :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}}. \quad (2.40)$$

2.2.4 Aspects photophysiques des mesures de FCS : état triplet et ACF

Généralement, l'intensité de fluorescence est supposée varier linéairement avec l'intensité d'excitation et les concentrations des fluorophores dans leurs états singulets fondamental et excité sont constantes au cours du temps. Cependant, pour des intensités d'excitation plus importantes pour lesquelles le taux d'excitation est du même ordre de grandeur que le taux de désexcitation de l'état singulet excité, la saturation de la fluorescence ainsi que d'autres phénomènes photo-induits peuvent entrer en jeu. Ainsi, dans les mesures de FCS, la transition vers des états non fluorescents crée des fluctuations qui s'ajoutent à celles dues à la diffusion des molécules dans le volume confocal. Le temps caractéristique de ces transitions vers ou depuis ces états transitoires photo-induits est généralement beaucoup plus petit que le temps caractéristique de diffusion. Alors la partie sub-unitaire de la fonction d'autocorrélation peut être factorisée en une fonction $G_D(\tau)$ dépendant des propriétés de diffusion et $X(\tau)$ dépendant des propriétés photophysiques du fluorophore :

$$\begin{aligned} g^{(2)}(\tau) &= 1 + G_D(\tau) X(\tau) \\ &= 1 + G_D(\tau) \frac{P_1(\tau)}{\bar{P}_1}, \end{aligned} \quad (2.41)$$

avec $P_1(t)$ la probabilité qu'un fluorophore soit dans l'état excité $|S_1\rangle$ à l'instant t et \bar{P}_1 la moyenne temporelle de probabilité qu'un fluorophore dans le volume confocal soit dans l'état $|S_1\rangle$.

Dans le cas d'un système à deux niveaux singulets et un niveau triplet, il est possible de calculer l'évolution temporelle de $P_1(t)$ et sa moyenne temporelle en

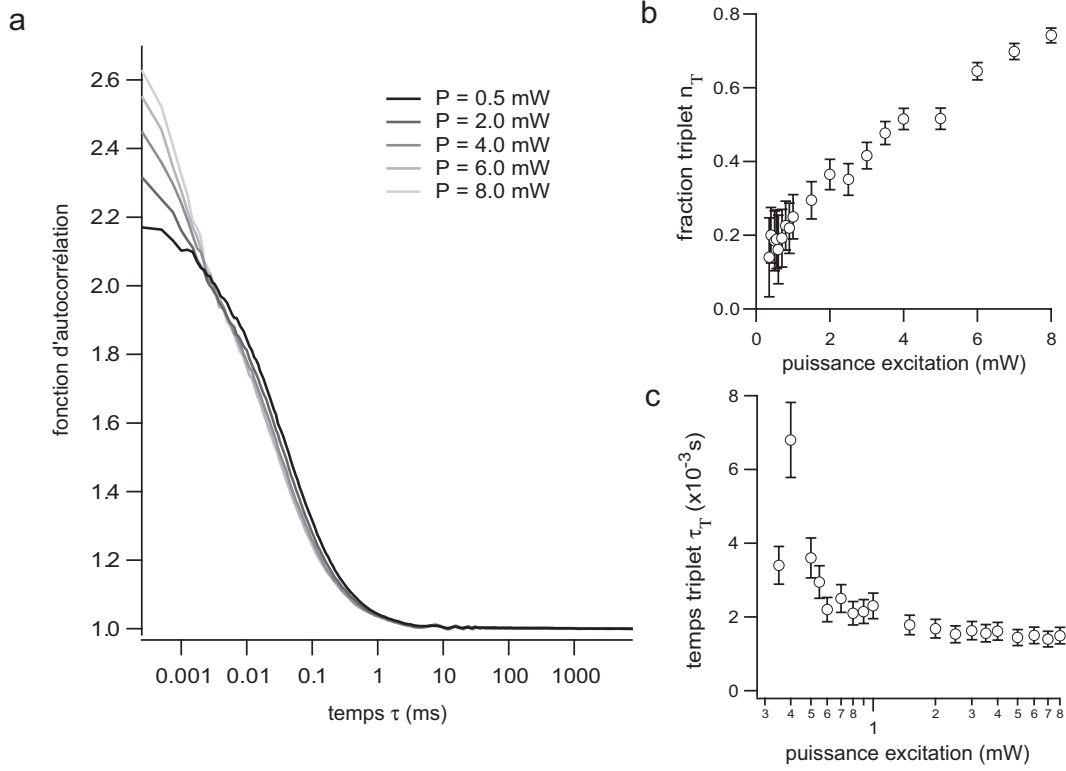


FIG. 2.7 – ACF et état triplet de la Rhodamine 6G.

a) La fonction d'autocorrélation de la Rh6G en solution est mesurée pour différentes puissances d'excitation en entrée de la face arrière de l'objectif de microscope. Lorsque la puissance d'excitation augmente, l'ACF se déforme et laisse apparaître un épaulement aux temps courts, correspondant à des fluctuations de fluorescence dues au peuplement de l'état triplet. On peut également noter la diminution du temps de diffusion correspondant au photoblanchiment de la Rh6G pour des puissances d'excitation élevées. b) Amplitude de la fraction triplet en fonction de la puissance d'excitation. c) Temps triplet en fonction de la puissance d'excitation.

résolvant le système d'équations de taux régissant l'évolution de la population des trois niveaux d'énergie électroniques de la Rh6G. Alors :

$$\begin{aligned} g^{(2)}(\tau) &= 1 + G_D(\tau) \left[1 + \frac{\bar{T}}{1 - \bar{T}} \exp(-\tau/\tau_T) \right] \\ g^{(2)}(\tau) &= 1 + G_D(\tau) [1 + n_T \exp(-\tau/\tau_T)] \end{aligned} \quad (2.42)$$

en définissant la *fraction triplet* par $n_T = \bar{T}/(1 - \bar{T})$.

Les fonctions d'autocorrélation expérimentales sont tracées sur la figure 2.7a pour différentes puissances d'excitation. Ces fonctions d'autocorrélation présentent un épaulement aux temps courts lorsque la puissance d'excitation est importante. Cet épaulement correspond aux fluctuations de fluorescence induites par le peuplement d'un état triplet non fluorescent. La fraction de molécules dans l'état triplet n_T augmente avec la puissance d'excitation. Au contraire, le temps de vie de l'état triplet τ_T

diminue lorsque la puissance d'excitation augmente.

2.2.5 Modification de la valeur de $g^{(2)}(0)$: le temps mort du détecteur

La photodiode à avalanche utilisée dans cette thèse a un temps mort de l'ordre de $50 \mu\text{s}$, c'est-à-dire qu'elle ne peut pas détecter deux photons arrivant avec un décalage temporel inférieur à $50 \mu\text{s}$. Afin de limiter cet effet de temps aveugle, le faisceau de fluorescence est séparé en deux par un cube séparateur avant d'être envoyé sur deux photodiodes à avalanche ; nous mesurons alors la corrélation croisée entre les photocourants issus de ces deux photodiodes. Notre corrélateur ayant une résolution temporelle de $25 \mu\text{s}$, nous ne sommes alors plus sensibles au temps mort de chaque détecteur. La fonction d'autocorrélation dans le cas de la mesure de la diffusion de la Rh6G en solution (diffusion 3D) dépend donc du nombre de détecteurs utilisés :

$$g_{1 \text{ détecteur}}^{(2)}(\tau) = 1 - \frac{1}{N} \exp[-k_{\text{détecteur}}\tau] + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (2.43)$$

$$g_{2 \text{ détecteurs}}^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (2.44)$$

où $k_{\text{détecteur}}$ est l'inverse du temps mort du détecteur.

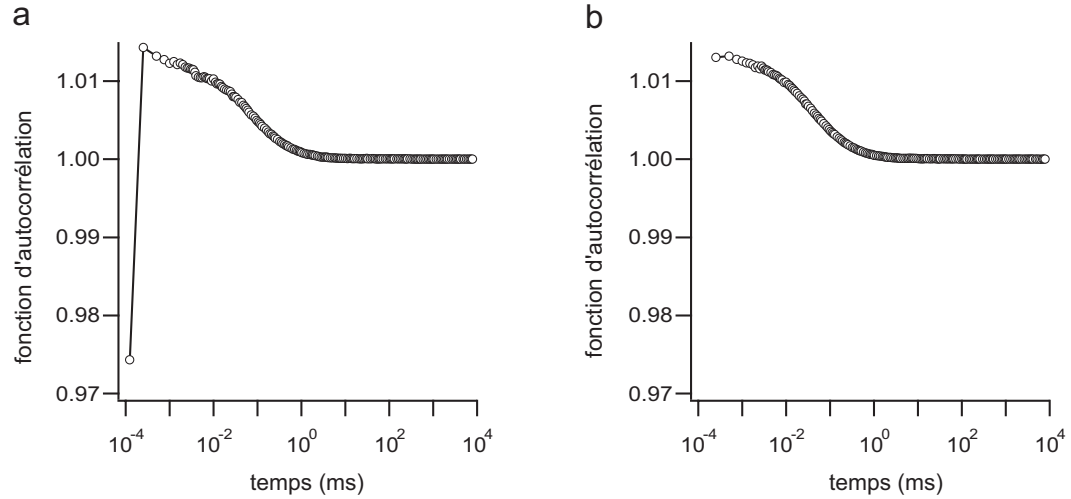


FIG. 2.8 – Effet du temps mort d'un détecteur unique sur la forme de l'ACF de la rhodamine 6G en solution.

a) Autocorrélation du photocourant issu d'un seul détecteur. b) Corrélation croisée des photocourants issus des deux détecteurs. Seul le montage avec un seul détecteur est sensible au phénomène de dégroupement de photons.

Cette différence dans la fonction d'autocorrélation peut être vérifiée expérimentalement (voir figure 2.8).

2.2.6 Facteur de correction pour le bruit de fond

En pratique, l'intensité du photocourant provenant d'un détecteur est la somme du photocourant en l'absence de bruit de fond $i_0(t)$ et d'un bruit $b(t)$: $i(t) = i_0(t) + b(t)$. Nous noterons $g_0^{(2)}(\tau)$ la fonction d'autocorrélation en l'absence de bruit. Si l'on peut faire l'hypothèse qu'il n'y a pas d'impureté diffusant dans le faisceau pompe, qui pourrait introduire un bruit de fond corrélé, le bruit de fond est supposé être complètement aléatoire. Il n'y a alors aucune corrélation entre $b(t)$, $b(t + \tau)$, ni entre $i_0(t)$ et $b(t)$. Par conséquent, la fonction d'autocorrélation en présence de bruit s'écrit :

$$\begin{aligned} g^{(2)}(\tau) &= 1 + \frac{\langle (\delta i_0(t) + \delta b(t)) (\delta i_0(t + \tau) + \delta b(t + \tau)) \rangle}{\langle i(t) \rangle^2} \\ g^{(2)}(\tau) &= 1 + \frac{\langle \delta i_0(t) (\delta i_0(t + \tau)) \rangle}{\langle i(t) \rangle^2} \\ g^{(2)}(\tau) &= 1 + \left(\frac{\langle i_0(t) \rangle}{\langle i(t) \rangle} \right)^2 g_0^{(2)}(\tau) \\ g^{(2)}(\tau) &= 1 + \left(1 - \frac{\langle b(t) \rangle}{\langle i(t) \rangle} \right)^2 g_0^{(2)}(\tau) \end{aligned} \quad (2.45)$$

Le bruit n'a donc un effet que sur l'amplitude de la fonction d'autocorrélation et donc sur la mesure du nombre de molécules fluorescentes dans le volume confocal. Celui-ci est surestimé par rapport au nombre réel de molécules. La détermination des divers temps caractéristiques n'est en revanche pas affectée.

2.2.7 Forme générale d'une ACF pour une espèce de molécules

La fonction d'autocorrélation obtenue théoriquement pour une espèce donnée diffusant en solution est donc une fonction avec plusieurs épaulements successifs, correspondant respectivement à la diffusion rotationnelle, au peuplement de l'état triplet et à la diffusion translationnelle. Le comportement aux temps courts reste lié au phénomène de dégroupement de photons. La figure 2.9 résume ces différents effets, ainsi que leurs temps caractéristiques.

2.2.8 Cas de plusieurs espèces

Si la *MDE* peut être décrite par un profil gaussien dans les trois dimensions et que les différentes molécules en présence sont en mouvement de diffusion libre 3D, la fonction d'autocorrélation prend la forme suivante :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{T}{1 - T} \exp[-\tau/\tau_T] \right) \sum_{i=1}^M \frac{f_i}{1 + \frac{\tau}{\tau_{Di}}} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_{Di}}}}, \quad (2.46)$$

avec N le nombre total de molécules dans le volume confocal V_{eff} . Les M populations ayant les temps de diffusion τ_{Di} doivent de plus remplir la condition : $\sum_i f_i = 1$.

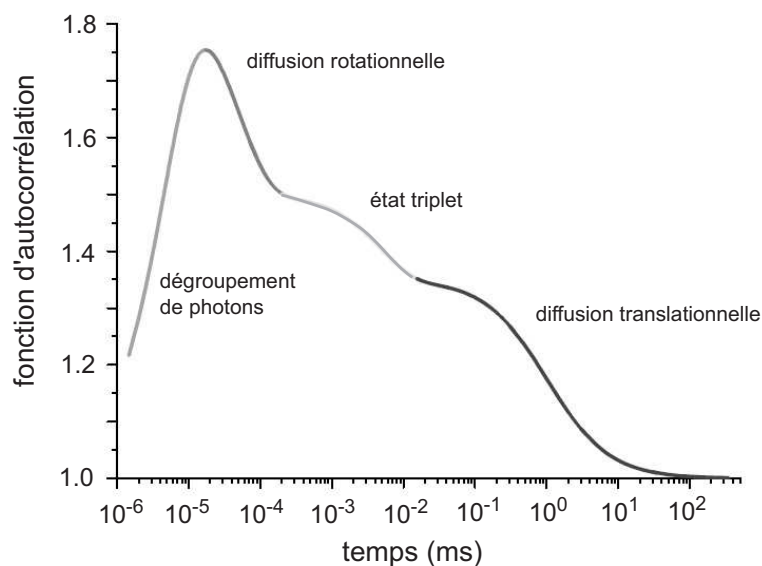


FIG. 2.9 – ACF théorique pour une espèce diffusante.

Les temps caractéristiques des différents phénomènes mesurables sont typiquement quelques dizaines de ns pour le temps de diffusion rotationnelle, quelques μ s pour le temps de vie de l'état triplet et la ms pour le temps de diffusion translationnelle.

Le dégroupement de photons est un effet quantique : l'émission d'un photon est suivie d'un temps mort qui est le temps nécessaire pour que le fluorophore venant d'émettre soit à nouveau excité.

La FCS est sensible à la diffusion rotationnelle : si chaque fluorophore est modélisé par un dipôle d'absorption et un dipôle d'émission, l'intensité de fluorescence est dépendant de l'orientation du dipôle, même si le laser d'excitation est non polarisé. Figure adaptée de [Schwille 01].

2.3 Montage utilisé

2.3.1 Description du montage

La figure 2.10 décrit le montage expérimental que nous utilisons, basé sur le montage de microscopie confocale de fluorescence et largement inspiré de celui proposé dans [Brock 98].

Notre microscope confocal est réalisé à partir d'un microscope inversé *Zeiss Axiovert 200M* (Zeiss, Jena, Allemagne). Un laser à ion argon fournit la lumière d'excitation des fluorophores à une longueur d'onde de 488 nm. Sa puissance est réglée à l'aide de filtres neutres placés sur le chemin optique du faisceau (non représentés) ; la taille du faisceau laser est réglée à l'aide d'une lunette de Galilée servant d'expandeur de faisceau (expandeur de faisceau 5× BE05X-A, Thorlabs) afin de couvrir la lentille arrière de l'objectif de microscope (β est défini comme le rapport entre la largeur à $1/e$ du profil d'intensité du faisceau exciteur et le diamètre d de la lentille. On choisit $\beta = 1$). Le faisceau est ensuite réfléchi sur un miroir dichroïque (miroir dichroïque XF2010 (505 DRLP), Omega Optics). La courbe de transmission du miroir

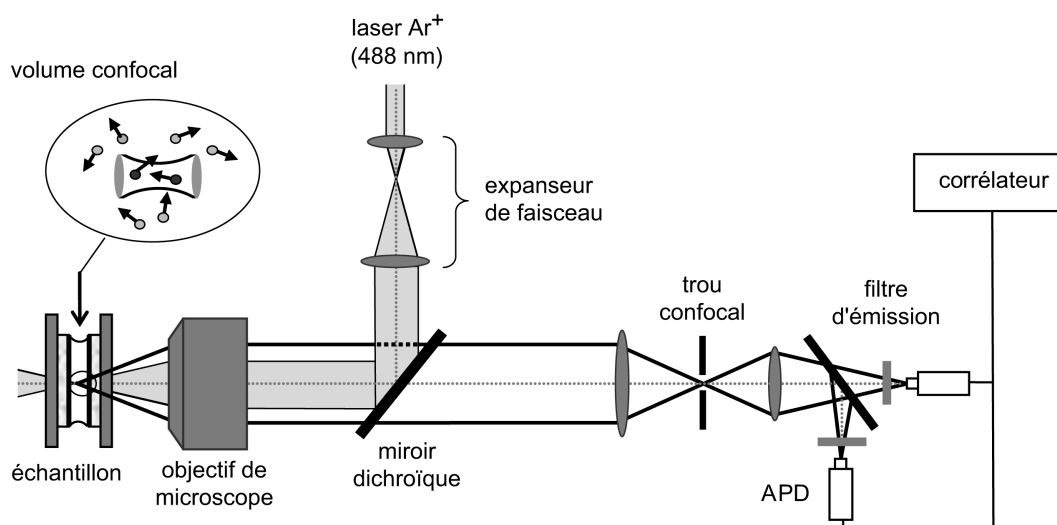


FIG. 2.10 – Montage classique de FCS.

dichroïque en fonction de la longueur d'onde (figure 2.11) montre une transition rapide entre une région de réflexion et une zone limitée de transmission, la transition s'effectuant autour de 510 nm. Ce miroir diélectrique est un miroir multicouche diélectrique, conçu pour travailler sous une incidence de 45°, pour réfléchir le faisceau pompe ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$) et pour transmettre la fluorescence ($\lambda_{em} \approx 550 \text{ nm}$ pour la Rhodamine 6G dans l'éthanol).

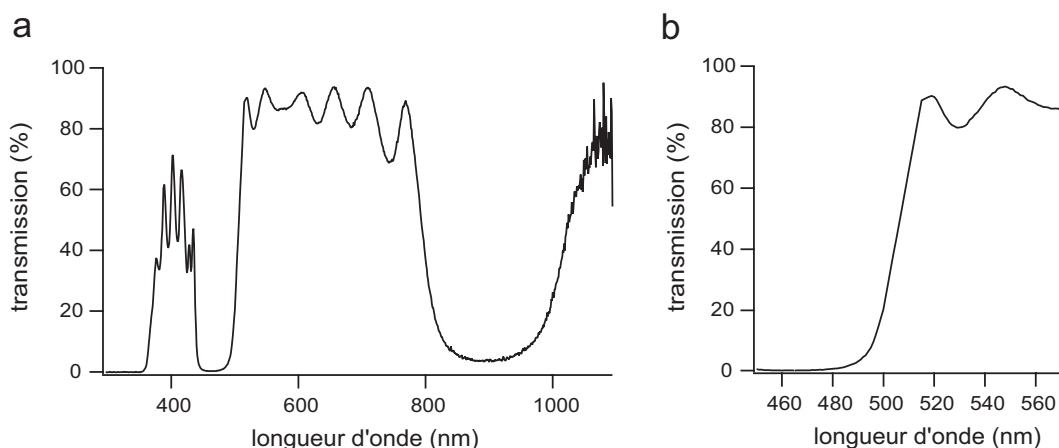


FIG. 2.11 – Caractéristiques du miroir dichroïque XF2010 (505 DRLP), Omega Optics.
a) Spectre de transmission tracé pour la gamme de longueurs d'onde 300-1100 nm.
b) Zoom sur la zone 450-570 nm. Tiré du site web de Omega Optics : <http://www.omegafilters.com/front/curvomatic/spectra.php?part=XF2010>

Le faisceau pompe réfléchi est alors focalisé sur l'échantillon, à l'aide d'un objectif de microscope à immersion de forte ouverture numérique (objectif à eau Zeiss

C-Apochromat de grossissement $40\times$ et d'ouverture numérique $NA = 1.2$). La fluorescence est collectée par le même objectif, séparée du faisceau excitateur par le miroir dichroïque, puis divisée par un cube séparateur 50/50 et envoyée sur deux photodiodes à avalanche *SPCM-AQR-13* (PerkinElmer Optoelectronics, Dumberry, Canada) après passage par un trou. Ce trou confocal (ici typiquement de diamètre 20 ou 50 μm) est placé dans le plan image de l'objectif de microscope, permettant ainsi de réduire la collection de fluorescence en dehors du plan focal (voir paragraphe 2.3.3). Les photodiodes à avalanche ont un fort rendement quantique (de l'ordre de 65%) et un faible bruit d'obscurité (taux de comptage dans le noir inférieur à 250 coups/s), et peuvent travailler en régime de comptage de photons uniques sur une large gamme de longueurs d'onde (400 à 1060 nm). Ces photodiodes à avalanche sont reliées à un corrélateur à canaux multiples *ALV-6010/160* (ALV-GmbH, Langen, Allemagne), qui réalise le calcul de la corrélation en direct, c'est-à-dire sans avoir à enregistrer la trace de l'intensité en fonction du temps. Ce corrélateur possède différents temps d'échantillonnage et temps de délai [Schatzel 85] : il permet de mesurer les corrélations temporelles avec une grande précision pour des délais allant d'une durée inférieure à la microseconde jusqu'à plusieurs minutes.

Enfin, le balayage du faisceau laser sur l'échantillon est réalisé en déplaçant l'échantillon à l'aide d'une platine piézoélectrique (*xyz*) de nanositionnement et nanobalayage *E-710.4CL* (Physik Instrumente, Walbronn, Allemagne). L'échantillon peut être translaté dans les trois directions de l'espace, la platine piézoélectrique étant pilotée informatiquement grâce à un logiciel développé sous *Labview* (National Instruments, Texas, Etats-Unis).

Il est à noter d'autre part que le statif du microscope est entièrement plongé dans une boîte *The Cube* (Suisse) à l'intérieur de laquelle la température peut être régulée. Des expériences ont ainsi pu être menées à 25°C comme à 37°C .

2.3.2 Le filtrage spectral

Le rapport signal sur bruit des mesures FCS dépend de façon critique du filtrage spectral effectué. D'abord, la longueur d'onde d'émission du laser Argon est sélectionnée par un filtre passe-bande étroit centré autour de 488 nm ; ce filtrage de l'excitation permet de couper les raies parasites émises par le plasma de ce laser à gaz. D'autre part, le miroir dichroïque réalise un autre filtrage, en réfléchissant la lumière émise par le laser et en transmettant les photons de fluorescence de longueur d'onde plus élevée. Néanmoins, ce filtrage reste généralement assez médiocre : il diminue l'intensité laser transmise de moins de trois ordres de grandeurs. Un autre filtre en détection est donc nécessaire. Un filtre passe-bande étroit est placé devant les détecteurs, centré sur la longueur d'onde spécifique du fluorophore utilisé. Ainsi, le filtre passe-bande utilisé pour des fluorophores tels que la Rh6g, la GFP ou le Bodipy est centré autour de 535 nm, avec une largeur spectrale de 45 nm. Une telle largeur spectrale permet de supprimer à la fois la lumière du laser diffusée par diffusion Rayleigh et la lumière émise par diffusion Raman, qui dans l'eau est décalée vers le rouge de 3380 cm^{-1} par rapport à la longueur d'onde du laser (le pic Raman

est donc situé à $\lambda_{Raman} = 584$ nm pour une excitation à 488 nm).

2.3.3 Le filtrage spatial

Un objectif de microscope est un assemblage de lentilles, caractérisé par deux grandeurs : son grandissement M et son ouverture numérique NA . Si l'objectif est immergé dans un milieu d'indice n , l'ouverture numérique NA est reliée à l'angle maximal de focalisation μ_{max} :

$$NA = n \sin \mu_{max} \quad (2.47)$$

Dans le cas de la microscopie conventionnelle, c'est-à-dire non confocale, un faisceau incident de longueur d'onde λ est focalisé par l'objectif de microscope en une tache (tache d'Airy) dont le rayon est limité par diffraction et définit la résolution du microscope (figure 2.12) :

$$w_{xymin} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.48)$$

Dans la direction de l'axe optique, on peut définir la profondeur de champ d_z , qui est la distance axiale sur laquelle l'objet observé est net :

$$d_z = n \frac{\lambda}{(NA)^2} \quad (2.49)$$

Néanmoins, tous les fluorophores placés sur la trajet du faisceau laser excitateur sont susceptibles d'émettre de la fluorescence, même ceux qui sont placés à une distance du plan focal supérieure à d_z .

Dans le cas de la microscopie confocale, un trou est placé dans le plan image de l'objectif de microscope, afin de filtrer la fluorescence provenant de fluorophores en dehors de la zone définie par la profondeur de champ d_z . Ce trou opère un filtrage spatial, en ne laissant passer que les photons provenant de fluorophores placés à une distance du plan focal inférieure à d_z .

Le trou réalise également une limitation transverse du champ, correspondant en première approximation à l'image géométrique du trou dans le plan focal objet de l'objectif. Le volume alors défini est appelé volume de détection ou volume confocal. Les meilleurs résolutions latérales et axiales obtenues avec un tel montage confocal sont données par [Pawley 95] :

$$w_{xymin}^{conf} = 0.4 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.50)$$

$$d_z^{conf} = 1.4 \frac{\lambda}{(NA)^2} \quad (2.51)$$

Tandis que la résolution latérale est améliorée, la résolution axiale est un peu détériorée, puisque légèrement supérieure à la profondeur de champ d_z (figure 2.13).

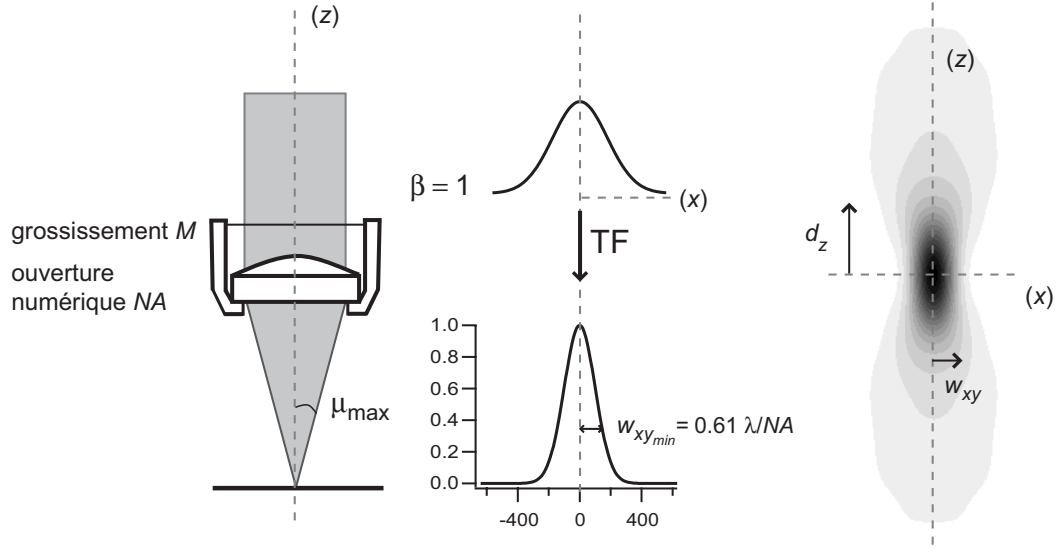


FIG. 2.12 – Focalisation d'un faisceau par un objectif de microscope.
a) Ouverture numérique d'un objectif de microscope et focalisation du faisceau incident.
b) Allure du volume d'excitation défini par la focalisation du laser. Définition de la résolution latérale et de la profondeur de champ

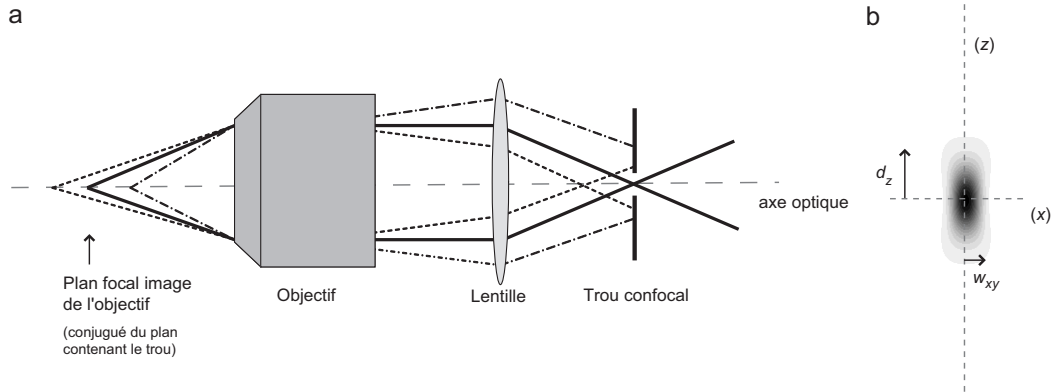


FIG. 2.13 – Focalisation d'un faisceau par un objectif de microscope et filtrage spatial par le trou confocal.
a) Le trou confocal ne laisse passer que les rayons issus d'objets placés à une distance axiale inférieure à la profondeur de champ d_z du plan focal objet. b) Allure du volume de collection défini par la focalisation du laser et le filtrage spatial du trou. β est le rapport de la largeur à $1/e$ du profil d'intensité du faisceau excitateur sur le diamètre d de la lentille.

2.4 Avantages de la FCS

Le premier avantage de cette technique de FCS réside dans l'utilisation d'un faible marquage : une faible surexpression des molécules d'intérêt est suffisante – et même nécessaire – pour réaliser des mesures. En effet, la FCS est sensible à l'amplitude des variations de fluctuation d'intensité et donc aux fluctuations du nombre de molécules présentes dans le volume confocal. Or le nombre de molécules contenues dans le volume confocal à un instant t est donné par une distribution de Poisson. Par conséquent, la racine carrée de la moyenne du carré des fluctuations (la variance des fluctuations) est donnée par :

$$\frac{\sqrt{\langle (\delta N)^2 \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\langle (N - \langle N \rangle)^2 \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}} \quad (2.52)$$

Le principe même de la FCS nécessite donc de réduire le nombre de molécules fluorescentes dans le volume confocal, de façon à ce que chacune d'entre elles contribue au signal mesuré de façon significative. C'est à cette condition que l'on peut réaliser des mesures de fluctuations spontanées et non coordonnées. Afin de mettre en œuvre des mesures de FCS de façon satisfaisantes, il est donc préférable de réduire la concentration des fluorophores et la taille du volume confocal de façon à ce qu'un nombre restreint de fluorophores soient présents en moyenne dans le volume confocal. Néanmoins, le signal de fluorescence doit être plus élevé que le bruit résiduel. Si les molécules fluorescentes présentes dans la solution étudiée sont trop peu nombreuses, il se peut que, pendant des durées importantes, aucune molécule fluorescente ne traverse le volume confocal et aucune information n'est alors apportée. Typiquement, on choisira un nombre moyen de particules dans le volume confocal entre 0.1 et 1000. Le volume confocal ayant une taille de l'ordre du femtolitre, ceci correspond à une concentration volumique de l'ordre de quelques dixièmes de nanomolaires ($< 10^{-9}$ M) à un micromolaire (10^{-6} M).

Un deuxième avantage est de pouvoir travailler avec une faible puissance d'excitation laser. Un bon rendement quantique de fluorescence permet par exemple de travailler à des puissances de l'ordre de quelques microwatts ($P \leq 4.0 \mu\text{W}$ dans le cas du travail sur cellules COS-7, 3A9 ou Jurkat étudiées par la suite ; $P \leq 2.6 \mu\text{W}$ pour le travail sur les globules rouges). Une si faible puissance d'excitation réduit nécessairement le rapport signal sur bruit ; néanmoins, elle permet d'une part de réduire le phénomène de photoblanchiment (voir 2.1.2, 5.1.6 et 5.2.2). De plus, un travail à faible puissance d'excitation permet de réduire l'élévation de température inhérente à une absorption par les milieux traversés : l'élévation de température pour une puissance de 100 mW pendant 10 s pour une longueur d'onde de 500 nm n'excède pas 0,2 K [Schönle 98].

2.5 Les applications de la FCS

2.5.1 Les applications de la FCS en solution

Un exemple : la mesure de taux de réaction

La FCS peut évidemment être utilisée pour mesurer des concentrations moléculaires et des temps de diffusion. Mais elle permet également de réaliser l'étude cinétique de dynamiques intramoléculaires ou de réactions chimiques. Afin qu'une expérience de FCS puisse fournir des informations sur une réaction chimique, elle doit conduire soit à une modification des propriétés de diffusion de l'espèce fluorescente, soit à une modification de l'efficacité quantique de fluorescence ou bien de la section efficace d'excitation de l'espèce fluorescente.

Réactions conduisant à un changement des propriétés de diffusion

Si une réaction conduit à un changement des propriétés de diffusion et si le temps caractéristique de la réaction est grand devant le temps de diffusion des molécules dans le volume confocal, les réactifs et les produits peuvent être traités comme des espèces indépendantes : la fonction d'autocorrélation décrivant cette situation est donnée par l'équation 2.46.

Si on suppose de plus que l'efficacité quantique de fluorescence et la section efficace d'excitation du fluorophore restent inchangées lors de la réaction, la mesure du temps moyen de diffusion (ou celle des deux temps de diffusion si les coefficients de diffusion sont suffisamment distincts) permet de calculer la proportion de réactif fluorescent ayant réagi (voir figure 2.14a).

Réactions conduisant à un changement de brillance

Dans une mesure FCS, les états transitoires non fluorescents ou le passage entre états ayant des brillances différentes induisent des fluctuations de fluorescence supplémentaires à celles causées par la diffusion des molécules à travers le volume confocal.

Si on suppose de plus que le temps de diffusion est beaucoup plus grand que le temps caractéristique de la réaction chimique et que les coefficients de diffusion des espèces fluorescentes sont égaux, la partie sub-unitaire de l'ACF peut alors être factorisée en deux termes : $G_D(\tau)$, qui dépend des propriétés de diffusion et une fonction $X(\tau)$, qui dépend du taux de réaction : $g^{(2)}(\tau) = 1 + G_D(\tau) X(\tau)$. Le temps caractéristique de réaction peut alors être mesuré par l'étude de l'épaulement présent sur l'ACF (figure 2.14b).

Mesure d'un taux de réaction par spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence (FCCS) à deux couleurs

Une technique dérivée de la FCS est la spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence à deux couleurs (dual-color FCCS, ou *dual-color fluorescent cross-correlation spectroscopy*).

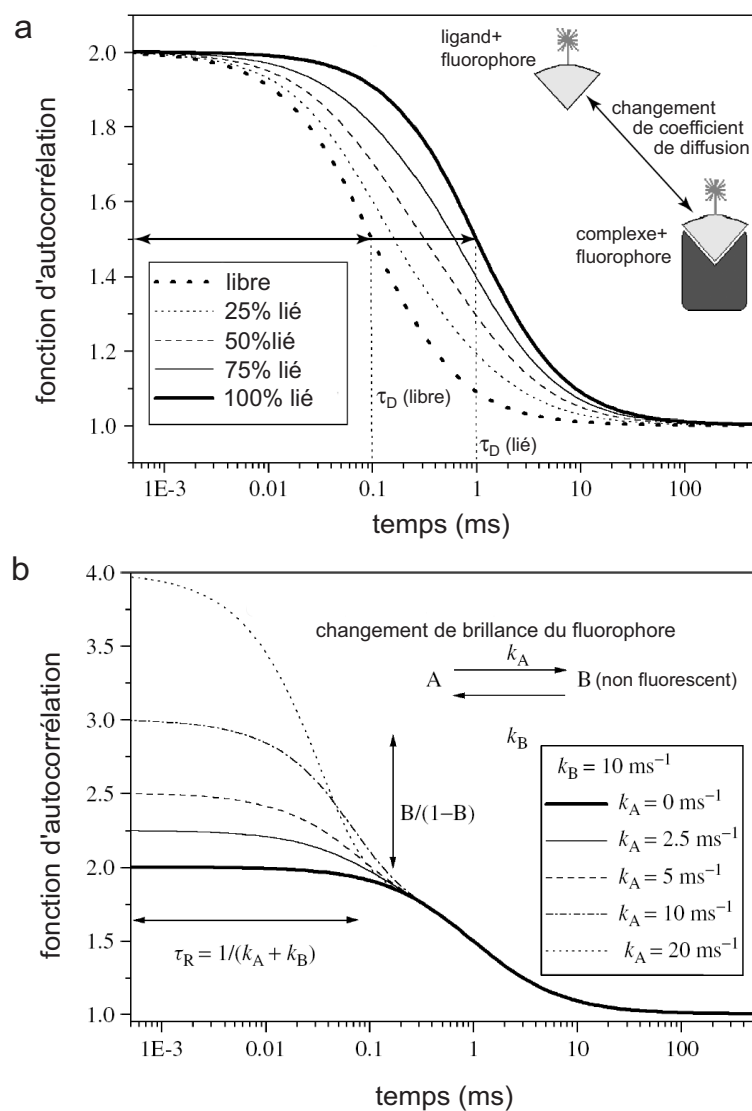


FIG. 2.14 – Mesure d'un taux de réaction par FCS.

a) Simulations d'ACFs permettant d'étudier la réaction d'agrégation entre une petite molécule (le ligand) marquée par fluorescence et une molécule plus grosse (le récepteur). Dans cette simulation, l'ordre de grandeur du temps caractéristique de réaction est bien plus long que le temps de diffusion des molécules à travers le volume confocal. D'autre part, le temps de diffusion du ligand est de 0,1 ms, alors que le temps de diffusion du complexe ligand-récepteur est de 1 ms. Si on suppose que la brillance des molécules reste inchangée par la réaction, la fraction de ligands liés peut être déduite de l'ACF comme étant la fraction de molécules diffusant avec un temps de 1 ms. b) Simulations d'ACFs pour une réaction dans laquelle la brillance des objets est modifiée. Ici, est étudiée une réaction unimoléculaire dans laquelle la molécule B n'est pas fluorescente. Le temps de diffusion de A et B à travers le volume confocal est de 1 ms. Le nombre de molécules moyen dans le volume d'observation est égal à $A + B = 1$, en notant A et B les fractions de molécules dans les états A et B. Figures adaptées de [Pramanik 04]

En FCCS à deux couleurs, deux lasers de longueurs d'onde distinctes définissent deux volumes d'excitation que l'on cherche à superposer le mieux possible. Chaque laser est choisi de façon à exciter un des deux fluorophores (il est néanmoins possible d'exciter les deux fluorophores par un seul laser, soit en utilisant une excitation à deux photons, soit en utilisant des fluorophores à grands décalages Stokes). Deux détecteurs de photons sont alors utilisés, chacun étant sensible à la longueur d'onde d'émission d'un des deux types de fluorophores.

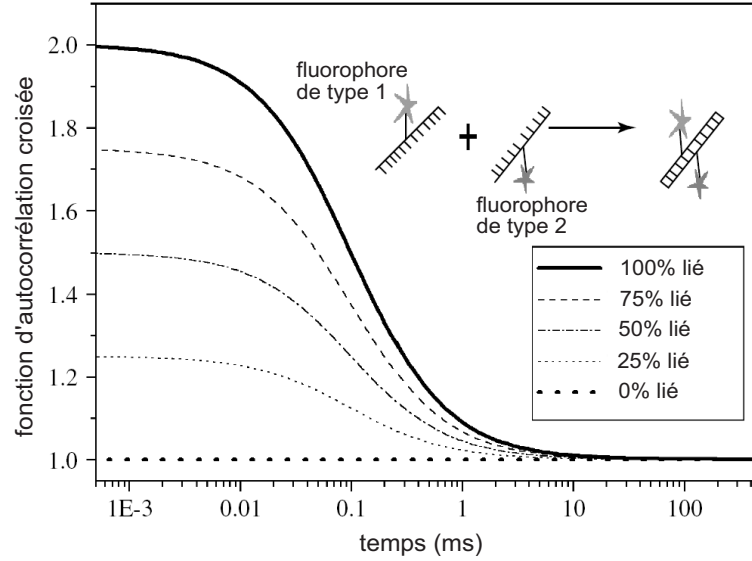


FIG. 2.15 – Mesure d'un taux de réaction par FCCS à deux couleurs.

Simulations d'une expérience dans laquelle deux monobrin d'ADN sont marqués de façon distincte par un fluorophore. La fonction d'autocorrélation à deux couleurs est calculée. Les temps de diffusion à travers le volume confocal de A, B et AB sont tous de 0,1 ms. Les concentrations des molécules ont été normalisées de façon à ce que le nombre moyen de brins A (respectivement B) – hybridés ou non – dans le volume soit de 1. Les brillances des fluorophores sont supposées égales et la détection croisée de fluorescence (cross-talk) est négligé. Figure adaptée de [Pramanik 04]

Une réaction bimoléculaire ($A+B \rightleftharpoons AB$) peut être étudiée par une expérience de FCCS à deux couleurs : les deux réactifs sont marqués par des fluorophores distincts. Les caractéristiques spectrales des détecteurs sont choisies de façon à ne pouvoir détecter que les photons émis par un seul type de fluorophore. Lors de la réaction d'agrégation, un complexe AB est formé, qui possède les deux marqueurs fluorescents. En notant I_1 et I_2 les intensités mesurées par chaque détecteur, la fonction d'autocorrélation croisée est définie par :

$$g_{cc}^{(2)} = 1 + \frac{\langle \Delta I_1(0) \Delta I_2(\tau) \rangle}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle} \quad (2.53)$$

L'étude de l'amplitude de cette fonction permet de connaître la fraction de molécules à l'état de complexes (figure 2.15).

On peut noter que le montage de FCCS à deux couleurs devient bien plus facile à mettre en place dès lors qu'une excitation biphotonique des fluorophores est utilisée. La bande d'absorption à deux photons des fluorophores étant beaucoup plus large que leur bande d'absorption à un photon, les deux lasers nécessaires à l'excitation à un photon des deux fluorophores peuvent être avantageusement remplacés par un unique laser permettant une excitation à deux photons. Cette astuce permet notamment de s'affranchir des problèmes de superposition des volumes d'excitation.

2.5.2 Les applications de la FCS pour l'étude de la diffusion membranaire

Utilisation de la FCS pour l'étude des membranes modèles

De nombreuses équipes (les équipes de W.W. Webb, P. Schwille, etc.) travaillent avec la FCS pour étudier l'organisation spatiale des lipides dans les GUVs. Selon leur nature, les lipides fluorescents intégrés dans les GUVs occuperont préférentiellement une certaine phase. Si la phase est de taille macroscopique, la mesure de la fonction d'autocorrélation permet alors de mesurer le coefficient de diffusion dans cette phase.

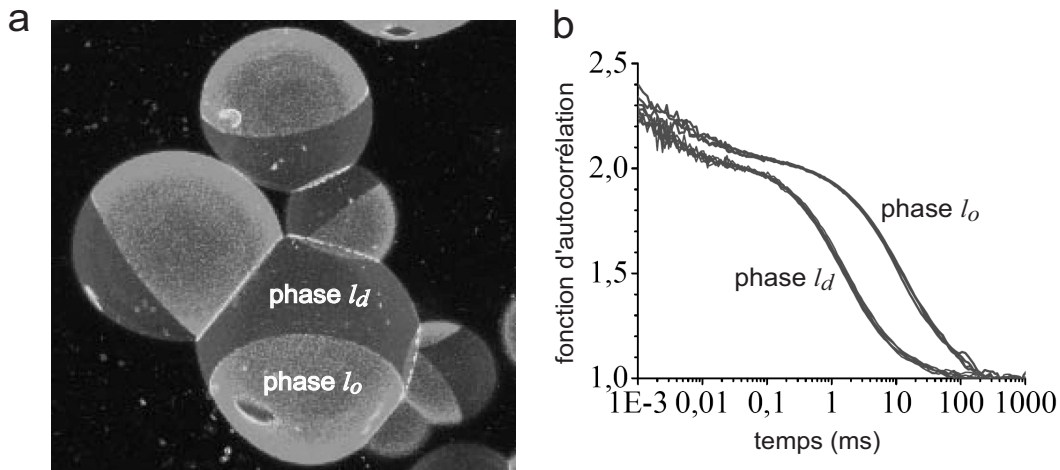


FIG. 2.16 – FCS sur membranes modèles.

a) Image par microscopie de fluorescence 3D de GUVs constitué d'un mélange ternaire DOPC/sphingomyéline/cholestérol, dans laquelle sont insérés deux types de fluorophores : DiI- C_{20} est préférentiellement présent dans les phases l_o , alors que Bodipy-PC se trouve dans les phases l_d . b) Courbes ACF correspondant à chacune des deux phases observées en a). D'après [Schwille 04].

Les mesures FCS permettent alors en retour, en mesurant des coefficients de diffusion moléculaire, de déterminer la composition des différentes phases membranaires macroscopiques [Kahya 03]. En plus de la possibilité de tracer un diagramme de phase, cette méthode permet d'étudier comment la dynamique des lipides varie entre les différentes phases et à l'intérieur même des phases.

La diffusion anormale

Les premières expériences de FCS sur membrane de cellules ont été réalisées seulement quatre ans après l'apparition de la méthode : dès 1976, l'équipe de W.W. Webb réalise des mesures de mobilité de lipides sur la membrane plasmique de myoblastes [Elson 76]

En 1996, Webb prend en compte pour la première fois le fait que la diffusion dans la membrane cellulaire n'est sans doute pas une diffusion libre. Afin de modéliser une mobilité latérale restreinte, il utilise le concept de diffusion anormale, dans lequel le déplacement carré moyen d'une particule croît comme une loi de puissance du temps, avec un exposant inférieur à 1 [Bouchaud 90, Saxton 93]. Une formule a d'ailleurs été proposée pour ajuster les fonctions d'autocorrélation ; il suffit de remplacer dans l'équation 2.40 le rapport τ/τ_D par $\tau/\tau_{\text{anormale}}$:

$$g_{\text{anormale}}^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + (\tau/\tau_{\text{anormale}})^\alpha} . \quad (2.54)$$

La diffusion anormale est un mode de diffusion spécifique, correspondant à la présence de minima d'énergie potentielle ayant une grande variété de profondeur et de largeur. Malheureusement, la fonction $g_{\text{anormale}}^{(2)}$ permet d'ajuster nombre de modes de diffusion qui ne sont pas tous des modes de diffusion anormale, telle que définie par Bouchaud et Georges [Bouchaud 90]. De plus, le nouveau paramètre α manque de sens physique. En particulier, il n'est pas possible d'inférer l'organisation de la membrane à partir des seuls paramètres τ_{anormale} et α .

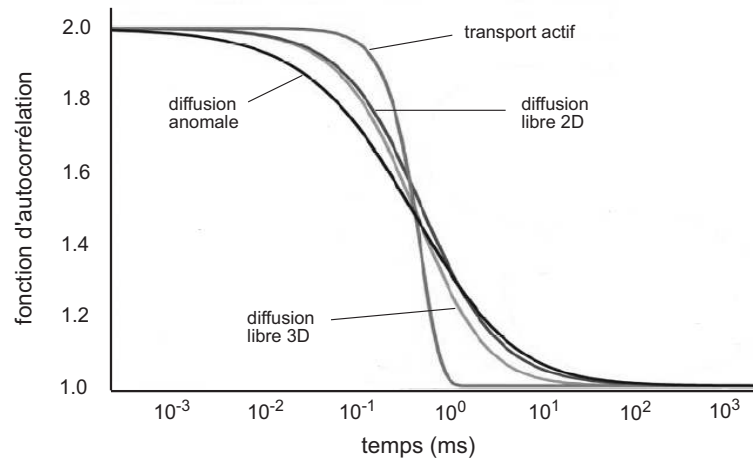


FIG. 2.17 – Forme des ACFs pour différents types de diffusion : diffusion confinée, diffusion anormale et transport actif

La forme de l'ACF peut donc donner quelques informations préalables : si l'ACF expérimentale n'est pas bien ajustée par une fonction caractéristique d'une diffusion libre, alors la diffusion ne peut être une diffusion libre. Néanmoins, on ne peut affirmer qu'une ACF expérimentale bien ajustée par une fonction décrivant une diffusion libre (respectivement anormale) correspond à un comportement de diffusion

libre (respectivement anormale). Nous reviendrons sur cette question dans le chapitre suivant.

2.6 Les difficultés liées à l'utilisation de la FCS

2.6.1 Le contrôle du photoblanchiment

Si la FCS a l'avantage par rapport au FRAP d'avoir accès à des informations à l'échelle de la molécule unique, elle ne permet pas de réaliser la mesure de la fraction immobile des molécules. Celles-ci ne peuvent pas être détectées, car subissent un photoblanchiment trop rapide.

Le photoblanchiment dynamique ne peut être contrôlé ; or il limite la durée d'observation de la molécule fluorescente, suggérant ainsi un temps de résidence plus faible que le temps réel dans le volume confocal. D'autre part, si l'intensité moyenne diminue régulièrement au cours du temps, le calcul de l'autocorrélation est faussé. Afin de pallier cette difficulté, il est préférable de travailler sur une petite fenêtre temporelle [Delon 04] : l'intensité peut alors être considérée comme presque constante. Il est également possible de travailler avec une puissance d'excitation plus faible. Néanmoins, la puissance d'excitation doit être suffisamment élevée pour conserver un bon rapport signal sur bruit : un compromis doit être réalisé, comme cela est expliqué dans le paragraphe 5.2.2.

2.6.2 Mesure de la taille du volume confocal

La mesure de la taille du volume confocal, c'est-à-dire de w_{xy} et w_z est réalisée par étude de la diffusion de la Rhodamine 6G (voir paragraphe 3.2.4). Cette mesure est peu précise et peut être remplacée de façon intéressante par l'utilisation d'un miroir placé au centre du volume confocal [Lenne 02]. Cette amélioration n'est possible que pour la réalisation de mesures de diffusion au voisinage du miroir.

2.6.3 Choix de l'ajustement de l'ACF

Un problème majeur rencontré dans l'utilisation de la FCS est lié à la nécessité d'interpréter les courbes d'autocorrélation obtenues. Nous avons déjà vu que sa forme est liée au type de diffusion, de façon non univoque. D'autre part, les fonctions usuelles, correspondant à de la diffusion libre, anormale ou dirigée ne sont pas toujours suffisantes pour ajuster la courbe expérimentale.

Gennerich et Schild ont montré [Gennerich 00, Gennerich 02] que le confinement des molécules fluorescentes dans des compartiments cellulaires modifie la forme des ACFs. Elles ne peuvent plus alors être ajustées par les fonctions classiques, mais des formules analytiques sont proposées dans ces études. Ces formules ne sont pas d'un emploi facile, en particulier parce qu'elles prennent en compte la géométrie des régions de confinement. Leur validité n'est vérifiée que pour des géométries simples et leur utilisation nécessite généralement la connaissance a priori de ces géométries.

Chapitre 3

Méthode expérimentale d'étude de la diffusion membranaire par FCS

Sommaire

3.1	FCS à une échelle spatiale sur une membrane cellulaire	92
3.1.1	Procédure de positionnement de la membrane dans le volume confocal	92
3.1.2	Forme des ACFs correspondant à la diffusion dans une membrane	93
3.2	FCS à différentes échelles spatiales	96
3.2.1	Méthodes pour varier le waist transversal du volume confocal	96
	Effets respectifs du diaphragme de diamètre variable et du télescope à focale variable sur le calcul du volume d'excitation	97
3.2.2	Calcul vectoriel du volume confocal dans notre configuration	100
	Focalisation du faisceau pompe par un objectif à forte ouverture numérique : calcul du volume d'excitation	100
	Calcul de la fluorescence : le volume de collection	101
	Le volume de détection ou volume confocal	102
3.2.3	Mesure du volume confocal avec des billes fluorescentes . . .	104
3.2.4	Mesure du volume confocal par étude de la diffusion de la Rhodamine 6G	104
3.2.5	Loi de diffusion mesurée par FCS	104
3.3	Calibration sur une membrane modèle : mesures sur GUVs	105
3.4	FCS à différentes échelles spatiales sur une membrane cellulaire	107

3.1 FCS à une échelle spatiale sur une membrane cellulaire

L'étude de la diffusion est généralement réalisée à une seule échelle spatiale. Nous allons étudier la forme des autocorrélogrammes obtenus lors de l'étude de la diffusion de l'analogue lipidique fluorescent FL-G_{M1} et de la protéine TfR-GFP dans les cellules COS-7.

3.1.1 Procédure de positionnement de la membrane dans le volume confocal

Il est d'abord nécessaire de placer la membrane cellulaire dans le plan de symétrie (xy) du volume confocal. La cellule d'intérêt est placée sur une lamelle de borosilicate, dans une chambre. Les cellules COS-7 sont adhérentes ; si les cellules ne sont pas adhérentes, la lamelle doit être préalablement traitée en présence de poly-L-lysine (charge négative). Il est préférable de travailler au voisinage du noyau, afin de limiter la quantité de membranes autres que la membrane plasmique présentes dans le volume confocal. Il est possible de se placer sur la membrane en contact avec la lamelle ou sur celle au-dessus du noyau. La cellule contient de nombreux éléments réfractifs (tableau 3.1). En travaillant au-dessus du noyau, le faisceau d'excitation ainsi que le faisceau de fluorescence subissent des réfractions et diffractions successives, ce qui altère la forme du volume confocal. En travaillant au contact de la lamelle, la diffusion peut-être modifiée par les points d'adhésion à la lamelle ainsi que les interactions entre les constituants membranaires et le borosilicate ou encore la poly-L-lysine. Nous avons néanmoins vérifié pour quelques molécules que les résultats obtenus dans les deux cas sont suffisamment compatibles, les barres d'erreurs se recouvrant. En règle générale, nos mesures de FCS ont été réalisées sur la membrane qui n'est pas en contact avec la lamelle.

TAB. 3.1 – *Inhomogénéité optique de la cellule. Tableau tiré de [Dunn 98]*

composante cellulaire	indice optique	références
cytoplasme, cellules de foie de rat (NRK)	1.38	[Beuthan 96]
mitochondrie, cellules de foie de rat (NRK)	1.40	[Beuthan 96]
lipides	1.48	[Beuthan 96]
cytoplasme	1.35	[Kohl 97]
protéines	1.50	[Kohl 97]
cytoplasme, cellules d'ovaire de hamster (CHO)	1.37	[Liu 96]
mélanine	1.7	[Vitkin 96]
noyau	1.4-1.6	

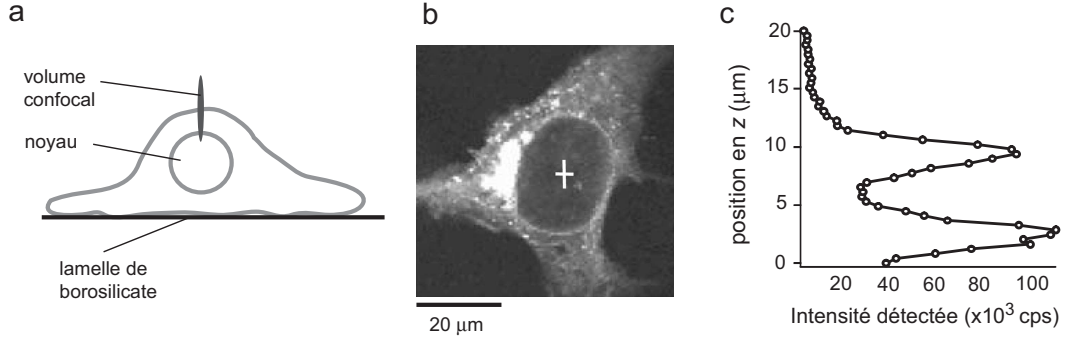


FIG. 3.1 – Positionnement de la membrane dans le volume confocal.

a) Les mesures de FCS sont réalisées sur la membrane qui n'est pas en contact avec la lamelle de borosilicate. b) Un scan 2D dans le plan (xy) est réalisé. La croix blanche correspond à la position en (xy) choisie pour faire le scan en (z). c) Scan axial de la cellule. La flèche correspond à la position en (z) pour faire la mesure FCS.

La chambre contenant les cellules est montée sur une platine piézoélectrique (xyz) de nanositionnement et nanobalayage. Un premier balayage transversal (xy) permet de localiser le noyau qui n'est pas marqué et apparaît donc comme une tache noire. Un scan axial (z) est ensuite réalisé afin de distinguer les deux côtés de la membrane (figure 3.1). La platine piézoélectrique permet alors de déplacer la membrane de la cellule dans le plan de symétrie (xy) du volume confocal. Par la suite, l'intersection entre la membrane et le volume confocal sera appelé spot confocal.

3.1.2 Forme des ACFs correspondant à la diffusion dans une membrane

Les cellules COS-7 ont été marquées d'une part par Bodipy- G_{M1} , un analogue fluorescent du ganglioside G_{M1} noté par la suite FL- G_{M1} (figure 3.2a), d'autre part par le récepteur à la transferrine auquel est attaché le fluorophore GFP et noté TfR-GFP (figure 3.3a). Des autocorrélogrammes (ACFs) expérimentaux sont mesurés pour FL- G_{M1} et TfR-GFP (figures 3.2 et 3.3). Afin d'ajuster ces autocorrélogrammes, il est nécessaire de choisir a priori un modèle de diffusion (cf. section 2.6.3). Trois sortes de fonctions ont été testées afin d'ajuster les ACFs expérimentales.

La première fonction (figure 3.2b) est un ajustement de type diffusion libre, décrit par l'équation suivante :

$$g_{2D}^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_d} \quad (3.1)$$

avec τ_d le temps de diffusion libre dans le volume confocal $\tau_d = w^2 / (4D_{micro})$.

Le second ajustement (figure 3.2c) correspond à une diffusion anormale et s'écrit :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \Gamma\tau^\alpha/w^2} \quad (3.2)$$

où α est le coefficient d'anomalie (cf. section 2.6.3).

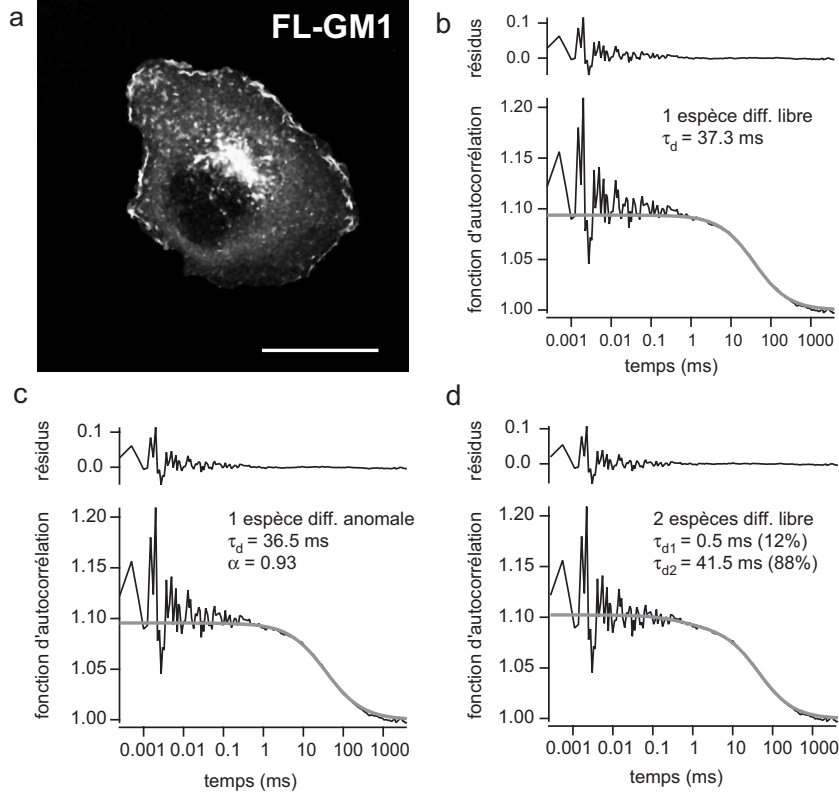


FIG. 3.2 – Différents modèles de diffusion sont testés pour ajuster une ACF obtenue pour FL-G_{M1}.

a) image obtenue par microscopie confocale à balayage d'une cellule COS-7 marquée FL-G_{M1}. b) diffusion libre à deux dimensions. c) diffusion anormale à deux dimensions. d) diffusion libre à deux dimensions de deux espèces.

Le troisième ajustement testé (figure 3.2d) correspond à la diffusion libre de deux espèces (ici, il s'agit de la même espèce FL-G_{M1}, mais avec une sous-population lente et une autre rapide) et est décrit par la fonction :

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{A \cdot N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_{d1}} + \frac{1}{(1-A)N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_{d2}} \quad (3.3)$$

Dans le cas de FL-G_{M1}, l'ajustement correspondant au modèle de diffusion libre en deux dimensions est suffisant pour décrire l'ACF. Les deux autres ajustements ont des résidus plus petits (figure 3.2) ; néanmoins, cela est dû uniquement au fait que ces deux ajustements utilisent un paramètre supplémentaire et non au fait que les modes de diffusion sont plus adaptés à la description du mouvement de FL-G_{M1}. En effet, le coefficient d'anomalie α a une valeur très proche de 1 ($\alpha = 0.93$) ; de plus, la fraction de molécules ayant une diffusion rapide est de l'ordre de 12%, ce qui est très faible. Si la forme de l'ACF obtenue par l'étude de la diffusion du lipide FL-G_{M1} dans la membrane cellulaire semble être la même que celle d'une ACF caractéristique d'une diffusion libre, le coefficient de diffusion obtenu est quant à lui dix fois plus faible que celui obtenu par étude de la diffusion de lipides fluorescents dans une membrane

artificielle [Fahey 77], ce qui implique que la diffusion de FL-G_{M1} n'est pas libre. L'étude seule de la forme de l'ACF n'est donc pas suffisante pour caractériser le type de diffusion étudié.

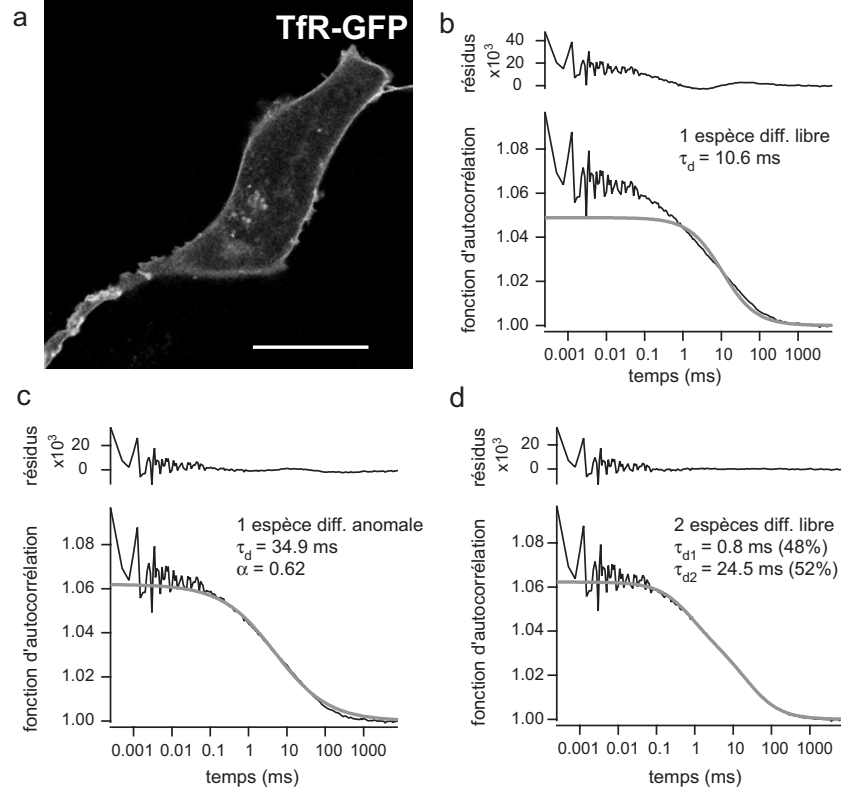


FIG. 3.3 – Différents modèles de diffusion sont testés pour ajuster une ACF obtenue pour Tfr-GFP.

a) image obtenue par microscopie confocale à balayage d'une cellule COS-7 marquée Tfr-GFP. b) diffusion libre à deux dimensions. c) diffusion anormale à deux dimensions. d) diffusion libre à deux dimensions de deux espèces.

Dans le cas de la protéine Tfr-GFP, l'ajustement correspondant à la diffusion libre en deux dimensions d'une espèce ne convient pas, comme le montre la courbe des résidus en fonction du temps (figure 3.3b). La qualité de l'ajustement est largement améliorée par l'utilisation de deux autres types de diffusion : la diffusion anormale en deux dimensions d'une espèce (figure 3.3c) ainsi que la diffusion libre en deux dimensions de deux espèces (figure 3.3d). Il est *a priori* difficile de choisir entre ces deux ajustements possibles, qui semblent tous deux donner satisfaction, même si les résidus sont plus faibles dans le cas de la diffusion libre de deux espèces. De plus, une connaissance des processus biologiques permet de choisir la fonction d'ajustement la plus appropriée. La fraction des molécules diffusant rapidement est de l'ordre de 48%, ce qui est compatible avec les images obtenues par microscopie confocale à balayage (figure 3.3a) : elles montrent des marquages intracellulaire et membranaire comparables. De plus, la fraction de molécules diffusant rapidement

augmente lorsque le laser n'est plus focalisé sur la membrane, mais décalé vers l'intérieur de la cellule. Le temps de diffusion court pourrait donc être attribué à des molécules diffusant librement dans la membrane du reticulum endoplasmique. Enfin, le coefficient de diffusion de cette sous-population ($2.3 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$) est en accord avec le comportement de diffusion rapide des protéines résidant dans la membrane du reticulum endoplasmique [Cole 96, Levin 01, Marguet 99]. La diffusion des protéines Tfr-GFP dans la membrane est donc décrite par le temps de diffusion lent et une forme d'ACF caractéristique de la diffusion libre en deux dimensions.

Nous avons vu dans la section 2.5 que les ACFs peuvent aussi demander des ajustements complexes, difficiles à mettre en oeuvre si on n'a pas de connaissance a priori de la géométrie de confinement. Nous allons montrer par la suite que la mesure du temps de diffusion à différentes échelles spatiales peut éviter l'utilisation d'ajustements nécessitant de nombreux paramètres. De plus, l'établissement des lois de diffusion FCS ne nécessite pas d'hypothèses sur le mode de diffusion. Celles-ci ne seront nécessaires que pour interpréter les lois de diffusion mesurées.

3.2 FCS à différentes échelles spatiales

Nous proposons ici une méthode originale pour étudier la diffusion dans les membranes, qui consiste en l'établissement de lois de diffusion par FCS. Les mesures de temps de diffusion sont réalisées à différentes échelles spatiales, c'est-à-dire à différentes tailles du volume confocal. Les lois de diffusion FCS sont alors obtenues en traçant les courbes représentatives du temps de diffusion à travers un volume confocal en fonction du carré du waist transversal de ce volume confocal.

3.2.1 Méthodes permettant de varier la taille du waist transversal du volume confocal

Plusieurs moyens sont à notre disposition pour varier la taille du volume confocal.

La première méthode a été utilisée dès 1987 par Yechiel et Edidin [Yechiel 87] pour réaliser des mesures de FRAP à différentes échelles spatiales. Elle consiste en l'utilisation des objectifs d'ouvertures numériques et de grandissements différents. Cette méthode a été également utilisée par Rotblat dans [Rotblat 04]. Néanmoins, elle ne permet pas de modifier la valeur du waist transversal de façon continue. De plus, les aberrations diffèrent d'un objectif à l'autre, modifiant la forme réelle du volume confocal.

La deuxième méthode est l'utilisation d'un télescope à focale variable. C'est la méthode utilisée par le groupe d'Okamoto dans [Masuda 05]. Un extenseur de faisceau motorisé constitué d'une lentille fixe et d'une lentille zoom motorisée est placé devant le port d'entrée du microscope. Ce télescope permet de varier de façon continue le diamètre du faisceau laser d'excitation tombant sur la face arrière de l'objectif du microscope et donc de varier de façon continue l'ouverture numérique réellement utilisée.

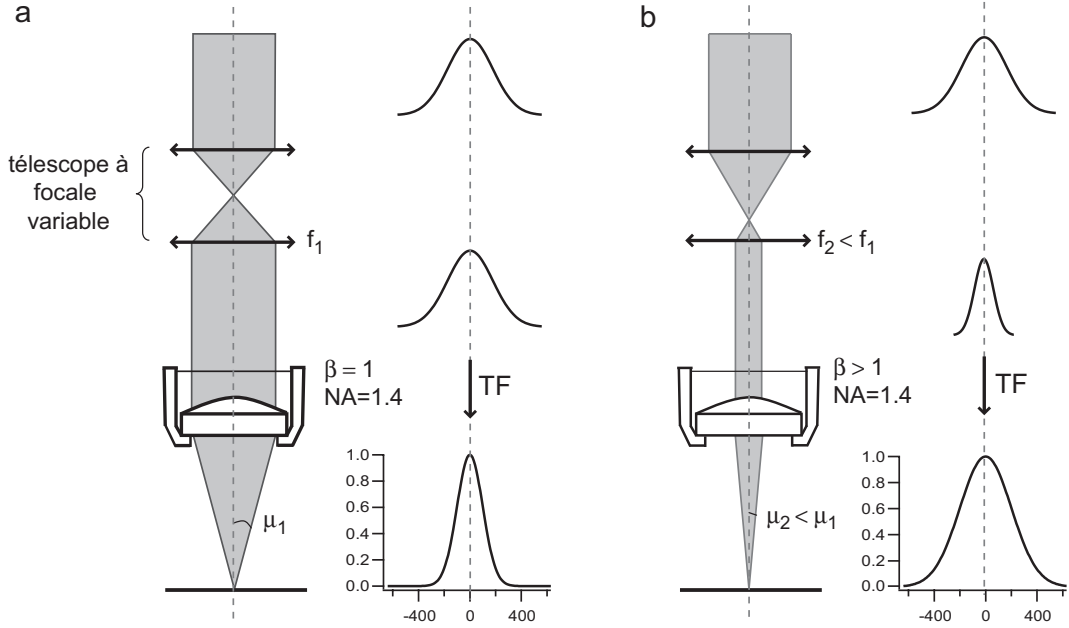


FIG. 3.4 – Modification de la taille du volume confocal par utilisation d'un télescope à focale variable.

L'utilisation d'un télescope permet de varier la taille du faisceau en entrée du microscope. Cela revient à modifier l'ouverture numérique, mais pas β , rapport de la largeur à $1/e$ du profil d'intensité du faisceau excitateur sur le diamètre d de la lentille.

La troisième méthode est décrite dans [Wawrezinieck 04] et consiste à placer un diaphragme de diamètre variable entre l'expandeur de faisceau et le miroir dichroïque (figure 2.10). Ce diaphragme coupe le faisceau transversal et augmente donc le rapport du rayon de la lentille arrière de l'objectif sur le rayon du faisceau d'excitation. Ceci permet de modifier la taille du volume confocal mais cette fois-ci sans modifier la valeur de l'ouverture numérique du microscope. Cette méthode est utilisée dans [Cézanne 04]. C'est la méthode que nous avons choisie et utilisée pour obtenir les résultats décrits dans cette thèse.

Effets respectifs du diaphragme de diamètre variable et du télescope à focale variable sur le calcul du volume d'excitation

En 1909, l'effet diffractif d'une lentille à forte ouverture numérique sur un faisceau non polarisé a été modélisé par Debye par une théorie scalaire [Debye 09]. Au lieu de décomposer le champ diffracté sur une base d'ondes sphériques, comme c'est le cas dans le principe d'Huyghens-Fresnel, cette théorie décompose le champ en ondes planes. En 1959, Richards et Wolf réalisent des calculs géométriques équivalents pour étudier la diffraction d'un faisceau polarisé dans une lentille à forte ouverture numérique [Wolf 59, Richards 59]. Cette approche a été reprise par N. Sandeau [Sandeau 05] pour calculer l'allure du faisceau excitateur au voisinage du foyer

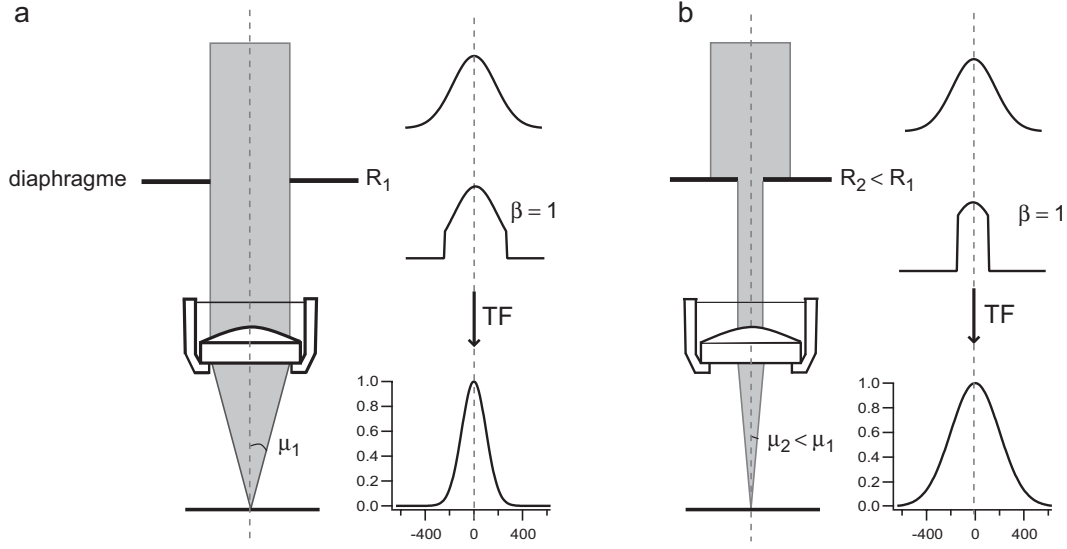


FIG. 3.5 – Modification de la taille du volume confocal par utilisation d'un diaphragme variable.

Le diaphragme coupe le faisceau en entrée du microscope. Cela revient à modifier β (rapport de la largeur à $1/e$ du profil d'intensité du faisceau excitateur sur le diamètre d de la lentille.) mais pas l'ouverture numérique de l'objectif

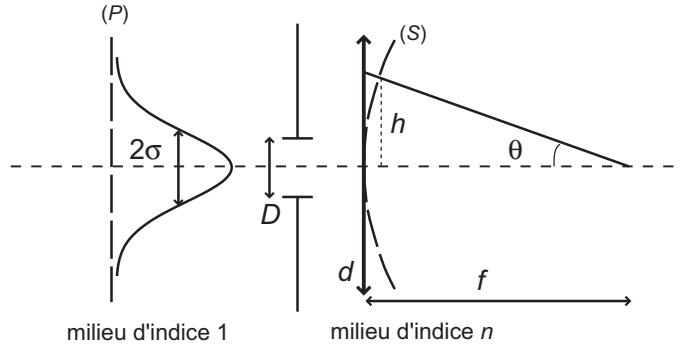


FIG. 3.6 – Configuration permettant de calculer l'effet du diaphragme.

Le faisceau laser avant le diaphragme est un faisceau gaussien de rayon σ . On note D le diamètre du diaphragme et d le diamètre de la lentille de focale f .

d'un objectif de microscope.

Dans notre configuration, le faisceau sortant de l'expandeur de faisceau et entrant dans le dispositif (téléscope à focale variable ou diaphragme) est un faisceau gaussien de mode électromagnétique transverse TEM_{00} et de polarisation \vec{P}_0 , dont l'amplitude sur le plan (P) avant le diaphragme est de la forme :

$$E(h) = E_0 \exp \left[- \left(\frac{h}{\sigma} \right)^2 \right] \quad (3.4)$$

avec σ l'extension spatiale du faisceau, définie par la demi-largeur à $1/e$ de la gaussienne. Après le diaphragme, et en négligeant la diffraction par ce diaphragme, l'expression du champ devient :

$$E(h) = \begin{cases} E_0 \exp \left[- \left(\frac{h}{\sigma} \right)^2 \right] & \text{si } h < D/2 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (3.5)$$

Rappelons d'autre part que β est défini comme le rapport entre la largeur à $1/e$ du profil d'intensité du faisceau excitateur et le diamètre d de la lentille. On place un diaphragme de diamètre D devant la lentille. Les paramètres à disposition sont liés par les équations suivantes :

$$\beta = \frac{d}{2\sigma} \quad (3.6)$$

$$\text{NA} = \frac{nd}{2f} \quad (3.7)$$

$$h = f \sin \theta \quad (3.8)$$

L'expression du champ avant la lentille donné par l'équation 3.5 devient alors :

$$E(h) = \begin{cases} E_0 \exp \left[- \left(\frac{n\beta \sin \theta}{\text{NA}} \right)^2 \right] & \text{si } h < D/2 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (3.9)$$

Alors que la surface d'onde avant la lentille est le plan (P), la surface d'onde après la lentille est la sphère (S). Pour préserver la conservation de l'énergie (rapport des surfaces entre les intersections du faisceau avec le plan (P) et la calotte sphérique (S)), l'amplitude du champ sur la sphère (S) est obtenue en multipliant l'amplitude du champ sur le plan (P) par le facteur de conservation d'énergie $\sqrt{n \cos \theta}$ [Richards 59]. D'autre part, ce passage d'une surface d'onde plane à une surface d'onde sphérique modifie le vecteur polarisation \vec{P}_0 en un vecteur $\vec{P}(\theta, \varphi)$, ce qui brise la symétrie de révolution autour de l'axe (z). Afin de conserver cette symétrie de révolution, il faudrait utiliser un faisceau pompe polarisé circulairement.

Le champ en sortie de la lentille qui modélise l'objectif à grande ouverture numérique est exprimé comme une somme d'ondes planes. Son expression est alors :

$$E_{diff}(\vec{r}) = \int_0^{2\pi} d\theta \int_0^{\theta'} d\varphi E_0 \exp \left[\frac{n\beta \sin \theta}{\text{NA}} \right] \exp \left[i\vec{k} \cdot \vec{r} \right] \sqrt{n \cos \theta} \vec{P}(\theta, \varphi) \sin 2\theta \quad (3.10)$$

avec $\theta' = \arcsin \left(\frac{D \text{NA}}{dn} \right)$, $\vec{P}(\theta, \varphi)$ le vecteur polarisation de chaque onde sphérique et $\sqrt{n \cos \theta}$ le facteur de conservation de l'énergie.

Lorsque l'on fait varier le diamètre du diaphragme, β reste constant, alors que l'ouverture numérique NA varie. Seule la borne d'intégration θ' est donc modifiée, alors que l'intégrande reste inchangée. Dans le cas du télescope à focale variable, le schéma de la figure 3.6 reste valable, avec $D = d$. C'est alors β qui varie et l'ouverture numérique NA qui reste constante : les bornes d'intégrations restent toujours les mêmes alors que l'expression de l'intégrande dépend de la valeur de β .

3.2.2 Calcul vectoriel du volume confocal dans notre configuration

Les résultats exposés dans cette section ont été obtenus grâce aux programmes développés par Nicolas Sandeau. Seul le cas de l'utilisation d'un diaphragme à diamètre variable est étudié ici. Les résultats concernant le télescope à focale variable sont néanmoins détaillés dans [Sandeau 05].

La forme du volume confocal a déjà été évaluée par un calcul scalaire par Hess et Webb [Hess 02]. Le volume d'excitation est alors calculé grâce à la théorie diffractive de Richards et Wolf, en utilisant une représentation par intégrales complexes. Le volume d'observation est quant à lui évalué par un calcul d'optique géométrique (ce qui est valable si le trou confocal est suffisamment grand pour ne pas diffracter le faisceau de fluorescence).

N. Sandeau a réalisé un calcul vectoriel de propagation du faisceau pompe et du faisceau de fluorescence, prenant ainsi en compte l'effet de la polarisation des différents champs [Sandeau 05]. Ne sont exposés ici que les résultats de calculs menés pour un faisceau pompe non polarisé : les volumes d'observation et de détection ont donc une symétrie de révolution autour de l'axe (z).

Focalisation du faisceau pompe par un objectif à forte ouverture numérique : calcul du volume d'excitation

Le calcul de l'allure du faisceau pompe focalisé par l'objectif de microscope est réalisé comme décrit dans l'équation 3.10.

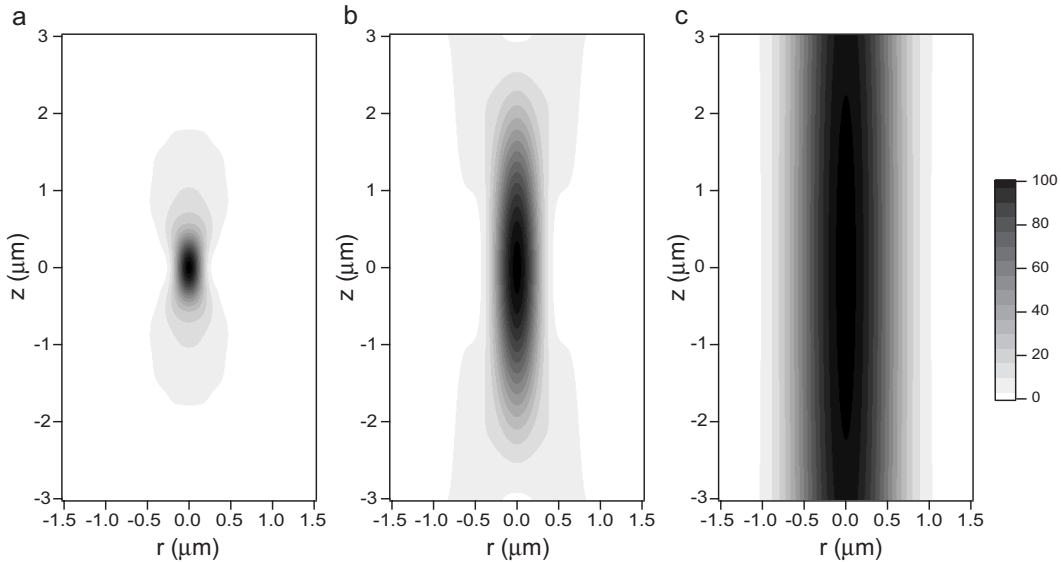


FIG. 3.7 – Calcul vectoriel du volume d'excitation pour différents rapports de l'ouverture du diaphragme de diamètre D sur le diamètre d de la lentille.

a) $d/D = 1$. b) $d/D = 2$. c) $d/D = 5$.

On suppose que le faisceau est polarisé rectilignement selon \vec{e}_x . Le calcul présenté

dans la section précédente est réalisé ici. Le profil d'excitation est calculé pour trois valeurs de β ($\beta = 1$, $\beta = 2$ et $\beta = 5$) et les résultats sont présentés dans la figure 3.7.

Calcul de la fluorescence : le volume de collection

On peut modéliser les fluorophores par des dipôles électriques. Cependant, ils ont généralement un grand coefficient de diffusion rotationnelle. Ceci permet de ne pas prendre en compte la polarisation d'émission de fluorescence. Chaque fluorophore est alors plutôt modélisé par une source émettant une onde sphérique. Afin de calculer le volume de collection, il est nécessaire de faire propager ces différentes ondes sphériques à travers l'objectif de microscope (toujours modélisé par une lentille) et le trou confocal.

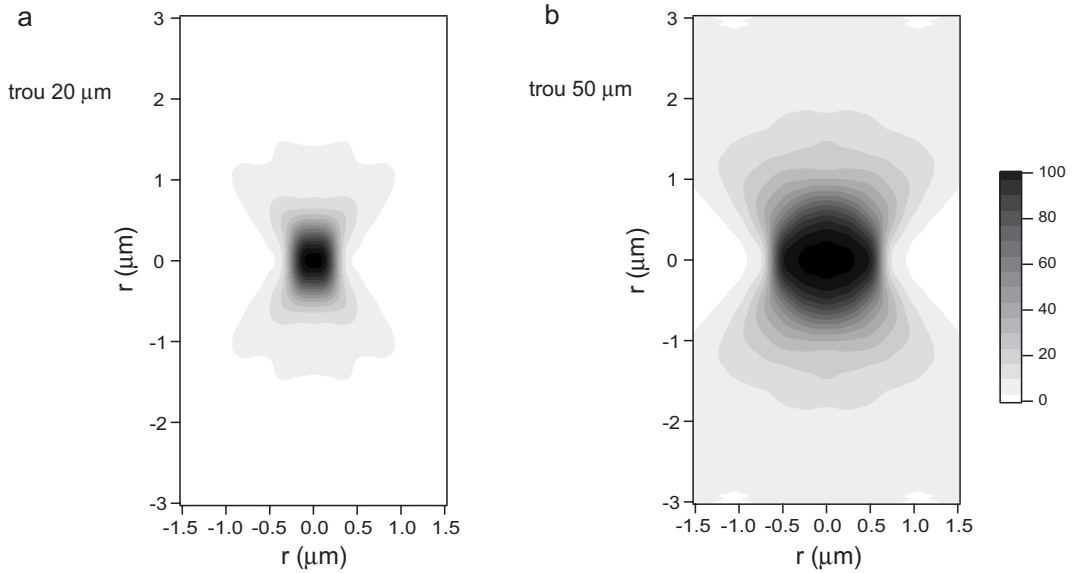


FIG. 3.8 – Calcul vectoriel du volume de collection pour différents diamètres de trou. a) trou de 20 μm . b) trou de 50 μm .

Le calcul de la fluorescence collectée par un objectif de microscope d'ouverture numérique $\text{NA} = 1.2$ et passant à travers des trous de 20 μm et de 50 μm a été réalisé. Les volumes de collection correspondants sont représentés sur la figure 3.8

Pour chaque position du fluorophore dans le plan focal, on fait propager une onde sphérique à travers l'objectif de microscope, qui est modélisé par un système de deux lentilles. La méthode utilisée est la même que pour modéliser le faisceau pompe, la seule différence étant qu'il y a cette fois-ci deux lentilles à traverser et donc deux changements successifs de surfaces d'onde ($S \rightarrow P$ et $P \rightarrow S$).

La figure 3.8 représente l'intensité de fluorescence juste derrière le trou confocal. On ne modélise donc pas la diffraction par ce trou confocal.

Le volume de détection ou volume confocal

Le volume de détection est obtenu par multiplication du volume d'excitation et du volume de collection. La figure 3.9 présente la forme des volumes confocaux pour différentes ouvertures du diaphragme et différents rapports d/D .

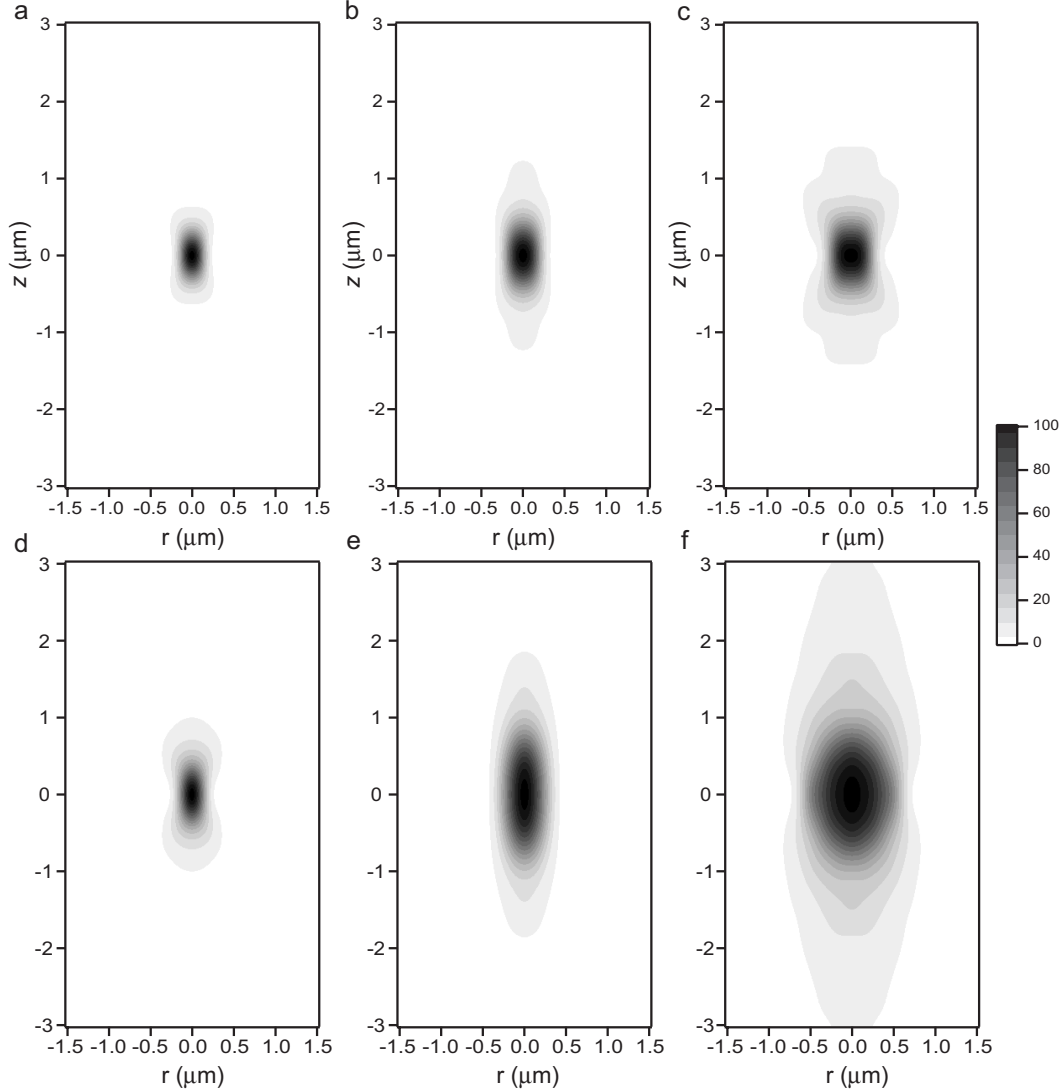


FIG. 3.9 – Calcul vectoriel du volume de détection pour différentes ouvertures du diaphragme et différents diamètres de trou.

a) $d/D = 1$, trou de $20\ \mu\text{m}$. b) $d/D = 2$, trou de $20\ \mu\text{m}$. c) $d/D = 5$, trou de $20\ \mu\text{m}$.
d) $d/D = 1$, trou de $50\ \mu\text{m}$. e) $d/D = 2$, trou de $50\ \mu\text{m}$. f) $d/D = 5$, trou de $50\ \mu\text{m}$.

Afin d'avoir des ACFs pouvant être ajustées par les fonctions usuelles, le volume de détection doit être le plus proche possible d'un volume gaussien. La figure 3.10 montre les profils transversal et axial de chaque volume de détection calculé. Elle montre que les volumes sont relativement gaussiens. Néanmoins, le caractère gaussien des volumes de détection se dégrade lorsque l'ouverture du diaphragme est réduite.

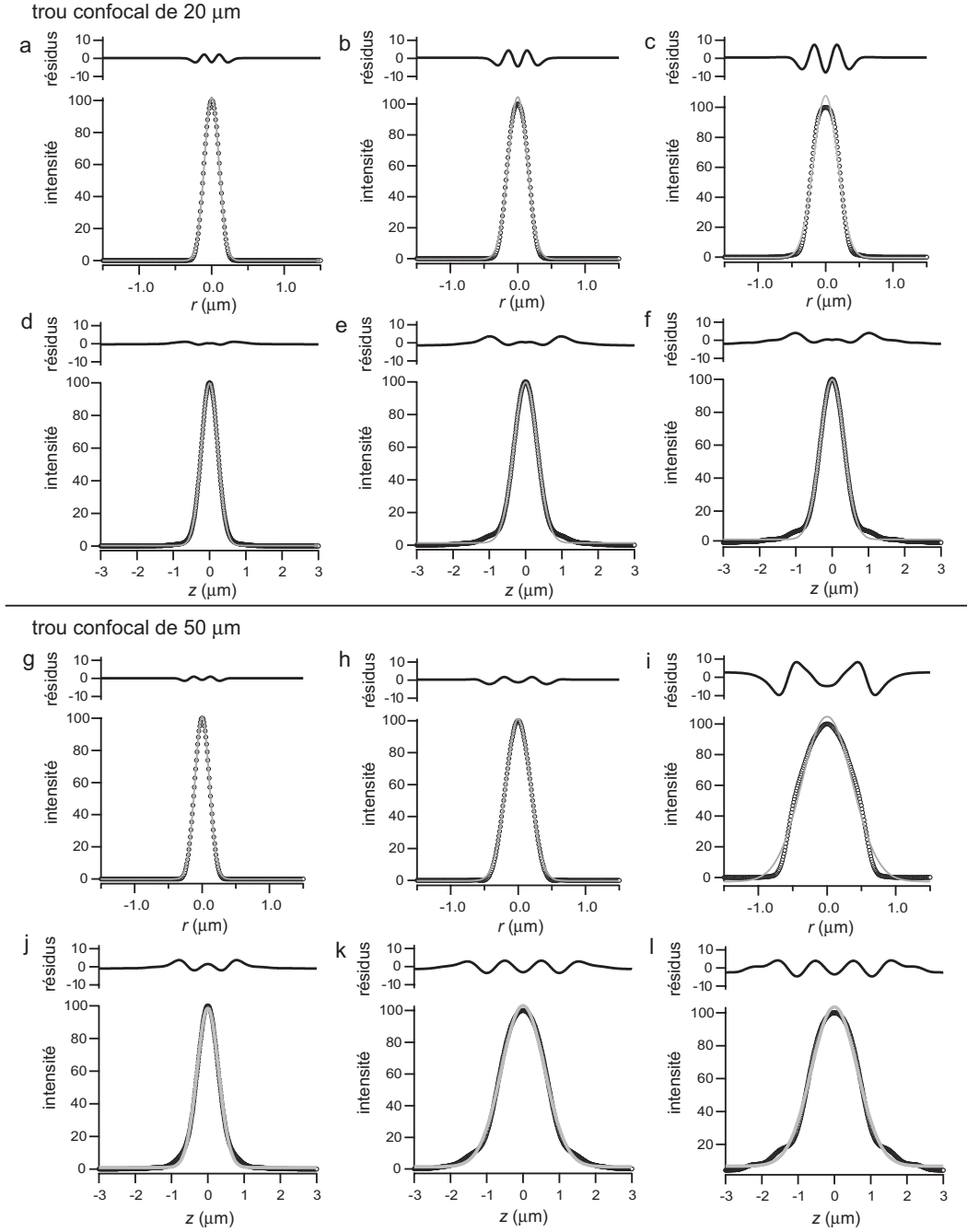


FIG. 3.10 – Profil du volume de détection.

a) Profil transverse pour $d/D = 1$ et un trou de $20\ \mu\text{m}$. b) Profil transverse pour $d/D = 2$ et un trou de $20\ \mu\text{m}$. c) Profil transverse pour $d/D = 5$ et un trou de $20\ \mu\text{m}$. d) Profil axial pour $d/D = 1$ et un trou de $20\ \mu\text{m}$. e) Profil axial pour $d/D = 2$ et un trou de $20\ \mu\text{m}$. f) Profil axial pour $d/D = 5$ et un trou de $20\ \mu\text{m}$. g) Profil transverse pour $d/D = 1$ et un trou de $50\ \mu\text{m}$. h) Profil transverse pour $d/D = 2$ et un trou de $50\ \mu\text{m}$. i) Profil transverse pour $d/D = 5$ et un trou de $50\ \mu\text{m}$. j) Profil axial pour $d/D = 1$ et un trou de $50\ \mu\text{m}$. k) Profil axial pour $d/D = 2$ et un trou de $50\ \mu\text{m}$. l) Profil axial pour $d/D = 5$ et un trou de $50\ \mu\text{m}$.

3.2.3 Mesure du volume confocal avec des billes fluorescentes

Afin d'étudier la forme du volume confocal, nous avons utilisé des microsphères fluorescentes (PS-Speck Microscope Point Source Kit, Molecular Probes). Ces microsphères sont des billes de 175 ± 5 nm de diamètre, remplies de fluorophores. Elles sont déposées sur une lamelle et recouvertes d'un milieu de même indice optique, afin de limiter les effets de diffraction. La lamelle est montée sur la platine piézoélectrique, de façon à pouvoir les mouvoir dans les trois directions x , y et z . Le volume décrit par le signal de fluorescence mesuré par les photodiodes à avalanche est le résultat de la convolution du volume confocal avec la forme de la bille : une déconvolution est nécessaire pour obtenir le vrai volume confocal. L'utilisation de billes de taille plus petite permettrait donc d'observer de plus petits détails de la forme du volume confocal.

Un balayage dans le plan de symétrie (xy) et un balayage le long de l'axe de symétrie (z) permettent respectivement le calcul du waist transversal w_{xy} et du waist axial w_z . Les résultats obtenus pour différentes ouvertures du diaphragme sont résumés dans la figure 3.11.

Nous avons donc montré qu'il est possible d'obtenir des volumes confocaux de forme adaptée et de taille variable en plaçant un diaphragme de diamètre variable entre l'expandeur de faisceau et le miroir dichroïque.

3.2.4 Mesure du volume confocal par étude de la diffusion de la Rhodamine 6G

Un autre méthode, plus rapide, permet de mesurer les waists axial et transversal d'un volume confocal. Elle nécessite de connaître le coefficient de diffusion d'un fluorophore, ce qui est le cas de la rhodamine 6G (Rh6G), dont le coefficient de diffusion a été mesuré à 22°C, pour une concentration de 0.5 nm : $D_{\text{Rh6G}} = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [Elson 74]. En mesurant l'ACF correspondant à la diffusion libre en trois dimensions du fluorophore, il est possible de l'ajuster par la fonction suivante :

$$g_{3D}^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \frac{1}{\sqrt{1 + s^2 \frac{\tau}{\tau_d}}} \quad (3.11)$$

avec $\tau_d = w_{xy}^2 / (4D_{\text{Rh6G}})$ et $s = w_z / w_{xy}$, le facteur de forme.

Grâce à l'ajustement de cette fonction, il est donc possible d'accéder aux valeurs de w_{xy} et de w_z .

3.2.5 Loi de diffusion mesurée par FCS

Les lois de diffusion FCS sont définies comme les courbes représentatives du temps de diffusion mesuré par FCS en fonction du carré du waist transversal w^2 . La taille du waist w est évaluée par mesure du temps de diffusion de la Rhodamine 6G comme expliqué dans la section 3.2.4.

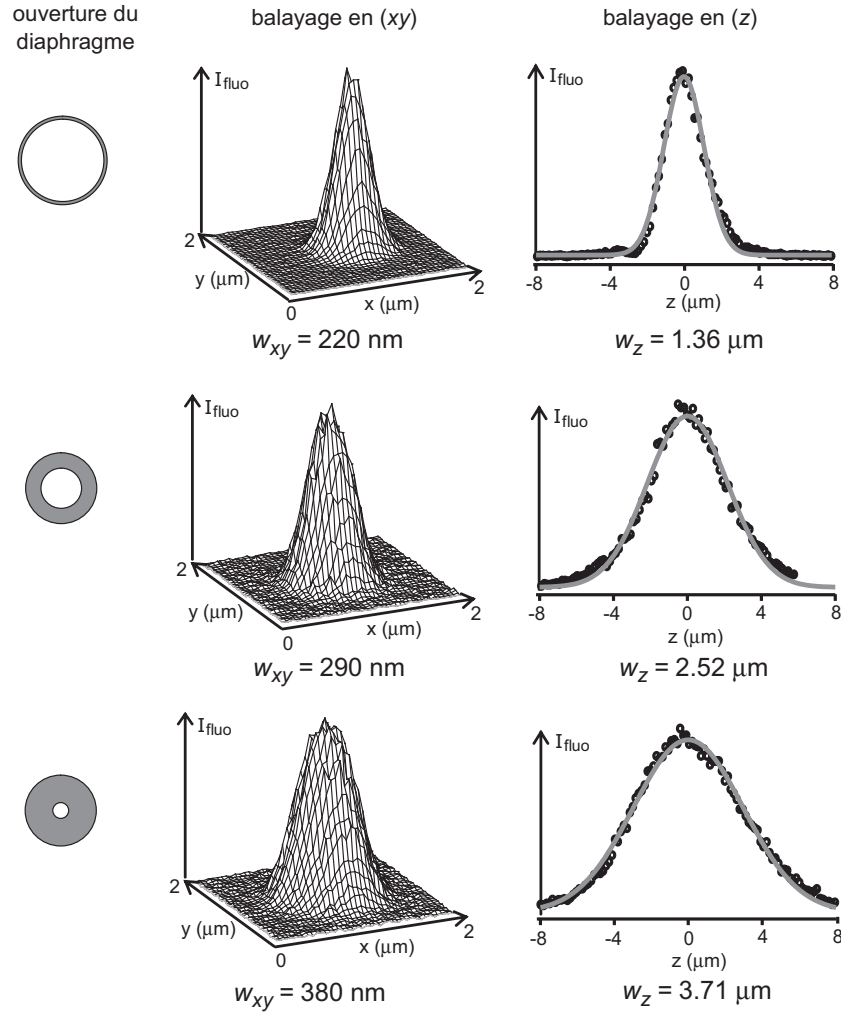


FIG. 3.11 – Mesure de la forme du volume confocal avec des microsphères de diamètre 175 nm.

Les balayages (xy) et (z) sont des résultats expérimentaux, donnés avant déconvolution. Les tailles annoncées des waists transversaux et axiaux sont données après déconvolution.

3.3 Calibration sur une membrane modèle : mesures sur GUVs

Nous avons testé notre montage en mesurant des lois de diffusion FCS sur des membranes modèles. Des vésicules géantes unilamellaires (GUVs, pour giant unilamellar vesicles) sont préparés par électroformation à partir d'un mélange de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et d'un analogue fluorescent de la phosphatidylcholine, Bodipy-C₅-PC (FL-PC), dans une proportion de 1000 pour 1. Ces liposomes sont formés d'une seule bicouche lipidique (figure 3.12a). La taille des vésicules formés varie de 10 μm à 100 μm . Une telle composition conduit à une phase unique liquide désordonnée. Les FL-PC, dispersés de façon homogène dans toute la bicouche ont

donc un mouvement de diffusion libre dans les deux dimensions de la bicouche. Nous avons réalisé des mesures FCS sur des GUVs suffisamment grands pour que les effets de courbure n'influent pas sur la forme de la fonction d'autocorrélation : le rayon du GUV doit être bien supérieur au waist du laser.

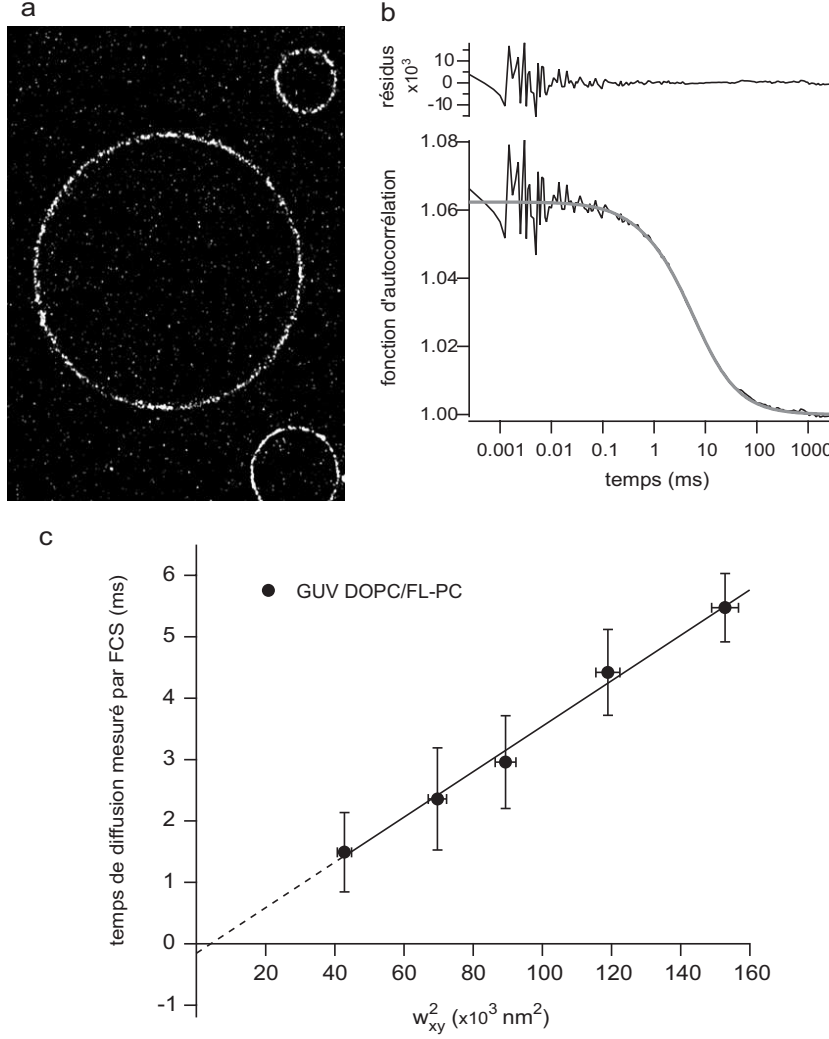


FIG. 3.12 – Mesure de la loi de diffusion FCS de phospholipides FL-PC dans une membrane artificielle.

a) Image de vésicules géants unilamellaires obtenue par balayage confocal. b) Fonction d'autocorrélation mesurée pour un waist transversal $w_{xy} = 330$ nm. c) Loi de diffusion FCS de FL-PC dans des GUVs de DOPC.

La figure 3.12b montre qu'une ACF de type diffusion libre en deux dimensions ajuste correctement les ACFs obtenues expérimentalement en étudiant la diffusion de FL-PC dans la membrane de DOPC. Le temps de diffusion dans le spot confocal τ_d peut donc être aisément mesuré. En mesurant successivement les temps de diffusion pour différentes tailles de spots confocaux, on peut tracer la loi de diffusion FCS. Elle montre que le temps de diffusion est proportionnel au carré du waist w_{xy}^2 . Ceci est

compatible avec notre hypothèse de diffusion libre et permet de mesurer le coefficient de diffusion de FL-PC dans une membrane de DOPC : nous mesurons $D_{\text{Rh6G}} = 6.8 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Cette valeur est compatible avec le résultat d'une autre mesure par le groupe de P. Schwille : $D_{\text{Rh6G}} = 6.3 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [Kahya 03].

3.4 FCS à différentes échelles spatiales sur une membrane cellulaire

Bien que les ACFs obtenues expérimentalement pour FL- G_{M1} et TfR-GFP soient bien ajustées par des fonctions correspondant à de la diffusion libre en deux dimensions, les lois de diffusion mesurées par FCS ne correspondent pas à une diffusion libre, pour laquelle $t_d = w^2/(4D_{\text{micro}})$, avec D_{micro} le coefficient de diffusion microscopique. Dans le cas de la diffusion de FL- G_{M1} et TfR-GFP, le temps de diffusion n'est pas proportionnel au carré du waist transversal w^2 mais est une fonction affine de w^2 . L'ordonnée à l'origine de la droite représentant la loi de diffusion de FL- G_{M1} pour les tailles de volumes confocaux plus grandes que la limite de diffraction est strictement positive. Au contraire, l'ordonnée à l'origine est strictement négative dans le cas de TfR-GFP.

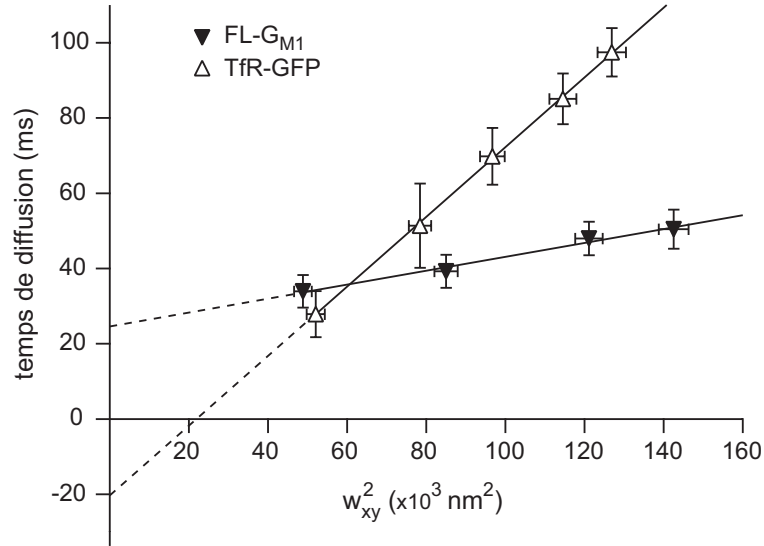


FIG. 3.13 – Lois de diffusion FCS de FL- G_{M1} et TfR-GFP

Il reste néanmoins à interpréter les lois de diffusion obtenues expérimentalement. Les lois de diffusion expérimentales ne sont ni des lois de diffusion libre, ni des lois de diffusion anormale. Des processus doivent exister, qui empêchent une diffusion libre des constituants de la membrane, mais ils ne peuvent être décrits comme des minima d'énergie potentielle dont les énergies de piégeage varient largement dans le temps et l'espace. Il nous faut donc développer des modèles de diffusion et calculer les lois de

diffusion FCS correspondantes, jusqu'à en trouver un qui puisse expliquer chacune des lois de diffusion obtenues expérimentalement. Il faut néanmoins bien noter que plusieurs modèles de diffusion peuvent conduire à des lois de diffusion semblables. D'autre part, le modèle choisi devra être cohérent avec les analyses biochimiques qui pourront être réalisées, les mesures de Single Particle Tracking, etc.

Nous savons par ailleurs que FL-G_{M1} est susceptible d'être un *marqueur des lipid rafts*, c'est-à-dire que les zones de membrane résistantes aux détergents (DRMs, pour Detergent Resistant Membranes) sont enrichies en FL-G_{M1}. D'autre part, il a été montré entre autre par Kusumi (voir section 1.3.2) que la libre diffusion du récepteur à la transferrine est empêchée par le cytosquelette, par l'intermédiaire de la queue cytoplasmique de cette protéine transmembranaire.. Nous allons vérifier si ces deux types de lois de diffusion correspondent bel et bien à deux types différents de processus de diffusion.

Dans le chapitre suivant, nous essaierons donc d'expliquer les deux ordonnées à l'origine et les pentes des lois de diffusion expérimentales par deux modèles de diffusion dans la membrane. Nous montrerons aussi que ces résultats expérimentaux (des ACFs ayant la même forme que dans le cas de la diffusion libre mais des lois de diffusions ne passant pas par zéro) ne sont pas paradoxaux mais peuvent en effet refléter les différents processus de diffusion dans une membrane structurée à une échelle inférieure au micron.

Chapitre 4

Simulations proposées pour expliquer les différents régimes de diffusion obtenus

Sommaire

4.1	Article paru dans <i>Biophysical Journal</i>	109
4.2	Réflexions sur la diffusion dans des domaines isolés . . .	124

Nous avons démontré au chapitre précédent la possibilité de mesurer des lois de diffusion FCS. Les lois de diffusion obtenues expérimentalement ne correspondent pas à de la diffusion libre. Nous proposons donc dans ce chapitre différents modèles susceptibles de nous aider à interpréter les lois de diffusion mesurées. La comparaison des lois expérimentales obtenues avec les lois de diffusion FCS issues de la simulation de divers comportements diffusionnels doit enfin être complétée par des expériences dans lesquelles les conditions expérimentales sont modifiées.

Dans l'article présenté ici sont étudiés d'une part un modèle de membrane dans lequel la diffusion des molécules est contrainte par le cytosquelette (*cytoskeleton fence model*), d'autre part un modèle de membrane inhomogène comprenant des domaines isolés. Pour chaque modèle testé, nous avons simulé la diffusion d'une molécule et calculé la fonction d'autocorrélation correspondante pour différentes tailles de faisceau exciteur. Nous avons donc pu tracer les lois de diffusion FCS correspondantes. Chaque fois, les lois de diffusion FCS sont assimilables à des droites pour les grandes tailles de spots confocaux. Nous montrons qu'il est possible de distinguer entre les deux types d'obstacles à la diffusion libre en étudiant le signe de l'ordonnée à l'origine des lois de diffusion FCS. L'utilisation de traitements biochimiques permettant de perturber l'organisation de la membrane nous permet également d'identifier les acteurs principaux du confinement moléculaire.

4.1 Article paru dans *Biophysical Journal*

Fluorescence Correlation Spectroscopy Diffusion Laws to Probe the Submicron Cell Membrane Organization

Laure Wawrezinieck,^{*†} Hervé Rigneault,^{*} Didier Marguet,[†] and Pierre-François Lenne^{*}

^{*}Institut Fresnel, MOSAIC Group, CNRS UMR 6133-Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Domaine Universitaire de Saint Jérôme, F-13397 Marseille Cedex 20, France; and [†]Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, MOSAIC group, CNRS UMR 6102-INSERM UMR 631-Université de la Méditerranée, Parc Scientifique de Luminy, Case 906, F-13288 Marseille Cedex 9, France

ABSTRACT To probe the complexity of the cell membrane organization and dynamics, it is important to obtain simple physical observables from experiments on live cells. Here we show that fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements at different spatial scales enable distinguishing between different submicron confinement models. By plotting the diffusion time versus the transverse area of the confocal volume, we introduce the so-called FCS diffusion law, which is the key concept throughout this article. First, we report experimental FCS diffusion laws for two membrane constituents, which are respectively a putative raft marker and a cytoskeleton-hindered transmembrane protein. We find that these two constituents exhibit very distinct behaviors. To understand these results, we propose different models, which account for the diffusion of molecules either in a membrane comprising isolated microdomains or in a meshwork. By simulating FCS experiments for these two types of organization, we obtain FCS diffusion laws in agreement with our experimental observations. We also demonstrate that simple observables derived from these FCS diffusion laws are strongly related to confinement parameters such as the partition of molecules in microdomains and the average confinement time of molecules in a microdomain or a single mesh of a meshwork.

INTRODUCTION

The processes responsible for the molecular confinement in live cell plasma membranes have been widely investigated in the last past years. These studies have demonstrated the existence of different mechanisms that could be responsible for the confinement of lipids and proteins in the plasma membrane, such as the cytoskeleton, the molecular clustering, or the extracellular matrix (1). Among them, the actin cytoskeleton has been shown to be responsible for confining transmembrane proteins (2) as well as lipids (3). In this case, the actin filaments act as barriers that hinder the diffusion of membrane components. Beside this cytoskeleton confinement, models of the membrane structure have included lateral lipid heterogeneities, thereby enriching the fluid mosaic view initially proposed by Singer and Nicolson (4). Evidences for membrane domains come mainly from biochemical studies, which show that some membrane constituents are resistant to solubilization by nonionic detergents at low temperature (5). The remaining detergent resistant membranes are found to be enriched in cholesterol and sphingolipids. These results have led to a postulate for the organization of the plasma membrane in which cholesterol and sphingolipid-rich domains coexist with more fluid domains enriched in phospholipids

with unsaturated hydrocarbon chains (6,7). Though increasing evidences that those domains exist, the data regarding their structure and dynamics are still very few and mainly indirect.

This lack of data principally results from the absence of appropriate tools. Indeed, optical tools such as confocal microscopy have not enabled the observation of separate domains and suggest that the size of the domains is below the optical resolution (<200 nm) (8). Alternative approaches, such as single-particle tracking (2,9,10) and optical tweezers (11), have a better spatial resolution and have shed a new light on this question. Single particle tracking and single dye tracking have proved to be valuable tools to measure the diffusion properties in membranes and to unravel hop diffusion. Nevertheless they suffer from two drawbacks: i), in most cases, these experiments require the labeling of a single molecule with a bead or a gold colloidal particle, which proves to be difficult; and ii), a large number of trajectories need to be recorded and analyzed to fit statistical criteria. One must be cautious in interpreting experimental results on a few diffusing particles, since distributions of hopping rates may be broad (12) and the detection of transiently confining structures thus requires the study of many molecules. In this respect, FCS may appear as a more appropriate technique since it analyzes an ensemble of molecules diffusing in the detection volume. Although FCS studies have reported anomalous diffusion in live cells (13), it has not been applied to study confinement in membranes. Here, we detail the rationales of the FCS analysis performed at various spatial scales to probe the submicron organization of the cell membrane. The method that we proposed recently (14) has been independently implemented in another context by Okamoto's group (15,16).

Submitted June 3, 2005, and accepted for publication August 30, 2005.

Address reprint requests to Pierre-François Lenne, Institut Fresnel, MOSAIC Group, CNRS UMR 6133-Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Domaine Universitaire de Saint Jérôme, F-13397 Marseille Cedex 20, France. Tel: 33-491-28-8049; Fax: 33-491-28-8067; E-mail: lenne@fresnel.fr.

Abbreviations used: FCS, fluorescence correlation spectroscopy; ACF, autocorrelation function; GFP, green fluorescent protein; BODIPY, 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene; FL-G_{M1}, BODIPY-ganglioside G_{M1}; TfR, human transferrin receptor; RhG6, rhodamine 6G; FWHM, full width at half-maximum; 2D, two-dimensional.

© 2005 by the Biophysical Society

0006-3495/05/12/4029/14 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.105.067959

FCS is a mature and powerful technique for measuring diffusion coefficients and chemical reaction rates both in vivo and in vitro (17). It measures the spontaneous fluctuations of fluorescence in an open volume defined by a focused laser and confocal optics. These fluctuations can arise in particular from the diffusion of fluorescent molecules into or out of this open sampling volume. To analyze statistically the fluctuations, one computes the time ACF, which provides information on diffusion properties.

Though the size of the detection volume is diffraction limited, the ACF can be altered by processes occurring on smaller spatial scales. It has been recently shown (18,19) that confinement in small cell compartments modifies ACFs computed by FCS. In these studies, analytical formula taking into account the volume and geometry of confined regions are proposed to fit experimental ACFs. Although this approach might be useful to determine diffusion coefficients in small volume compartments, its validity is restricted to simple geometries and its implementation is difficult without any a priori knowledge of the geometry.

In this article, we suggest observables that can be obtained from FCS and that are useful to detect confinement in microdomains. First, we emphasize the problems encountered when fitting ACFs, and point out the need for measuring the so-called FCS diffusion laws, instead of only interpreting the shape of ACFs measured at a single size of waist.

The manuscript is organized as follows: we first introduce and show FCS experimental diffusion laws for a lipid and a transmembrane protein. The studied lipid is FL-G_{M1}, which is considered to be a raft marker, and the transmembrane protein is TfR-GFP, diffusion of which is supposed to be hindered by the cytoskeleton meshwork. Interestingly, these two constituents exhibit two different FCS diffusion laws. To explain these results, we simulate in the second part different diffusion processes, which could explain the FCS diffusion laws that have been measured experimentally. We first address the basic issue of confinement of a molecule freely diffusing in an impermeable or permeable 2D domain, and then focus on restricted diffusion in multiple microdomains in mosaic geometries. Two geometries are explored more accurately: the first one accounts for isolated microdomains, in which molecules can partition dynamically ("partitioning microdomains"); and the second accounts for the actin meshwork. Finally, the experimental FCS diffusion laws are reinterpreted thanks to the new light shed by the simulations.

MATERIALS AND METHODS:

A list of the parameters used in the following is given in Table 1.

Cell culture and staining

All experiments are carried out on COS-7 cells (American Type Culture Collection No. CRL-1657).

Fluorescent conjugated lipid probe BODIPY-ganglioside G_{M1} (FL-G_{M1}) (Molecular Probes, Eugene, OR) is incorporated in the plasma membrane by a lipid exchange procedure (20).

To obtain the TfR-GFP recombinant protein expression, cells are transiently transfected with a mixture of the plasmid and ExGen 500 reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

FCS measurements are performed at 37°C at least 16 h after each of these incorporations.

FCS setup

Confocal fluorescence microscopy and fluorescence correlation spectroscopy are performed on a custom apparatus, which has been developed from an Axiovert 200 inverted microscope (Zeiss, Jena, Germany). The excitation light of the 488 nm line of an Ar⁺-ion laser is focused onto the sample through a Zeiss C-Apochromat 40×, numerical aperture = 1.2, water immersion objective. The fluorescence is collected by the same objective, separated from the excitation light by a dichroic mirror, then split by a 50/50 cube splitter and sent onto two avalanche photodiodes through 525–565 nm bandpass filters. Cross correlation between the two channels is preferred to autocorrelation of one channel, since it reduces artifacts due to the dead time of each detector and after pulses. A confocal pinhole (20 or 50 μm in diameter) reduces the out-of-plane fluorescence. Precise positioning of the cell membrane in the confocal volume is obtained by moving the sample step-by-step with a three-axis piezo-scanner, which is controlled by a digital controller (Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany). Scanning softwares are written with LabView (National Instruments, Austin, TX).

FCS measurements are performed by illuminating the sample with an excitation power of 3.5 μW at the back-aperture of the objective. Autocorrelation is processed by a hardware correlator (ALV-GmbH, Langen, Germany). Data are analyzed with built-in functions of IgorPro (Wave-metrics, Lake Oswego, OR).

Fitting of autocorrelation functions

In a standard FCS experiment, a diffusion measurement is carried out for a single size of the confocal volume, i.e., a single value of the laser beam transversal waist w at the focal plane of the focusing objective. The diffusion coefficient is determined from the measurement of the apparent diffusion time τ_d^{app} of a fluorescent molecule through the confocal volume, which is defined as the FWHM of the ACF. For free translational two-dimension diffusion, τ_d^{app} matches the actual diffusion time through the confocal volume $\tau_d^\infty = w^2/(4D_{\text{micro}})$, where D_{micro} is the microscopic diffusion coefficient of the fluorescent molecule in the plane of diffusion. If the diffusion is free, and in the case of a Gaussian approximation of the detectable emission intensity distribution, the ACF is given by (21)

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}}, \quad (1)$$

where N is the average number of molecules in the detection volume.

For anomalous diffusion, the mean-square displacement of particles is no longer proportional to time t as for free diffusion, but rather to t^α , with $0 < \alpha \leq 1$. This diffusion mode corresponds to molecules diffusing in the presence of multiple energy potential traps with binding energies that vary over wide ranges of time and space (22). Anomalous diffusion can also result from diffusion on a percolating cluster at the threshold. In FCS, if diffusion is anomalous, α can be determined from the ACF, which is given by

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_{\text{anomalous}}}\right)^\alpha}, \quad (2)$$

where $\tau_{\text{anomalous}}$ is equal to τ_d^{app} if $\alpha = 1$.

When diffusion is free, then $\alpha = 1$. We will show in the Experimental Evidence section that the converse is false.

TABLE 1 Main parameters used in the simulations

Parameter description	Symbol	Value/Range of values/Calculation
Simulation parameters		
Time step	Δt_0	2.10^{-6} s
Simulation box	A	Square, $10 \times 10 \mu\text{m}^2$
Total simulated time		$> 4.10^3$ s
Half-size of the domains	r	Radius of a circular domain/Half-size of the side of a square domain. Varied between 50 nm and 100 nm.
Mean elementary jump length	σ	Between $r/100$ and $r/20$
Microscopic diffusion coefficient	D_{micro}	Between 1.0 and $10.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$
Waist of the excitation focal spot	w	Between 0 and $1 \mu\text{m}$
Calculated parameters		
Apparent diffusion time	τ_d^{app}	FWHM of the autocorrelation function
Free diffusion time in the focal spot	τ_d^{∞}	$w^2/(4D_{\text{micro}})$
Free diffusion time in a single domain	τ_d^{domain}	$r^2/(4D_{\text{micro}})$ in a circular domain of radius r , $(1.122r)^2/(4D_{\text{micro}})$ in a square domain
Confinement time in a single domain	τ_{conf}	
Confinement strength	S_{conf}	$\tau_{\text{conf}}/\tau_d^{\text{domain}}$
Confinement size parameter	X_c	$\sqrt{(\text{Area of the focal spot})/(\text{Area of the domain})}$
Specific parameters for isolated microdomains		
Density of the domains	d	(Total area of the domains)/Area of the simulation box
Microscopic diffusion coefficient inside the domains	$D_{\text{micro}}^{\text{in}}$	Between 1.0 and $5.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$
Microscopic diffusion coefficient outside of the domains	$D_{\text{micro}}^{\text{out}}$	$3 D_{\text{micro}}^{\text{in}}$ (Dietrich et al. (29))
Probability of going into a domain	P_{in}	Between 0 and 1 (for $r/\sigma = 30$)
Probability of going out of a domain	P_{out}	Between 10^{-3} and 1 (for $r/\sigma = 30$)
Specific parameters for the meshwork		
Probability of crossing a barrier	P	Between 6.10^{-3} and 1 (for $r/\sigma = 5$)
Experimental outcomes		
Intercept time of the diffusion law in regime iii	t_0	
Effective diffusion coefficient	D_{eff}	
Partition of the molecules in microdomains	α	(Number of molecules in domains)/Total number of molecules

Size of the confocal volume

The size of the confocal volume can be controlled by selecting either with a diaphragm or a variable telescope (14,16) the lateral extension of the laser excitation beam falling onto the back-aperture of the microscope objective. Similar approaches have been implemented in fluorescence recovery after photobleaching experiments (23,24).

The size of the confocal volume can be inferred from the free diffusion time τ_d^{∞} of a fluorophore in the open confocal volume, and its known diffusion coefficient (Fig. 1). Here, Rh6G, of which the diffusion coefficient is known ($D_{\text{Rh6G}} = 2.8 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (21) is used to calibrate the size of the confocal volume. The radius of the illuminated observation area can be modulated between 190 and 400 nm. The Rh6G diffusion time through the confocal volume obtained by fulfilling the rear-aperture of the microscope objective allows the determination of the smallest waist accessible with our setup: $w_{\text{min}} = 190$ nm. In all experiments, the excitation power at the back-aperture of the objective is kept constant for all waist sizes. To validate the calibration protocol of the waists in the context of 2D diffusion measurements, we have studied the diffusion of Bodipy-PC probes freely diffusing in giant unilamellar vesicles (14). We have checked that the determination of the diffusion coefficient is correct and independent on the size of the waist as expected for free 2D diffusion.

Simulations of confined diffusion and FCS

Scheme of simulations

We have implemented simulations as close as possible to real FCS experiments. We have included a fluorescent molecule in an area A , which is

composed of a single domain or of multiple domains (Fig. 2). If not otherwise stated, the excitation laser beam is supposed to be Gaussian: $I(x, y) = I_0 \exp(-(x^2 + y^2)/w^2)$, where x and y are the Cartesian coordinates originating at the center of the area A . Depending on the objective back-aperture filling used, w can vary from 200 nm to 400 nm in a standard FCS setup.

The fluorescent molecule performs a random walk from a starting position that is randomly selected in the surface A . For the sake of simplicity and without any loss of generality, we simulate the walk of a single molecule. Simulating independent multiple molecules would not change the ACF profile but only its amplitude.

The random walk is performed as follows:

At each time step Δt_0 , the particle performs a jump $(\Delta X, \Delta Y)$, which is determined by two independent random variables with a Gaussian distribution centered on 0 and a standard deviation $\sigma_x = \sigma_y$. The jump length $\Delta R = \sqrt{(\Delta X)^2 + (\Delta Y)^2}$ is therefore a random variable with a standard deviation $\sigma = \sqrt{2}\sigma_x$. The microscopic diffusion coefficient D_{micro} is related to σ by $D_{\text{micro}} = \sigma^2/(4\Delta t_0)$. Typically, 10^9 – 10^{10} steps are calculated for a trajectory. The mean elementary jump length is kept small (from $1/100$ to $1/20$) with respect to the size of domains (see below).

Detection and ACF

At each time step, the detected intensity is computed assuming a Poisson distribution; the number of detected fluorescence photons n_{ph} for a particle at position (x, y) is given by a random variable following a Poisson distribution function with parameter $\beta I(x, y)$, where β describes the collection efficiency of the setup (25). To analyze fluorescence fluctuations, the normalized time autocorrelation function ACF is defined as

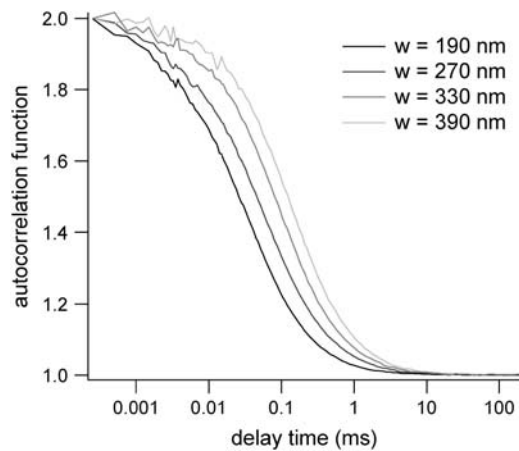


FIGURE 1 Rh6G autocorrelation functions measured by FCS at various beam waists w . The diffusion time is used to calibrate w .

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle n_{ph}(t)n_{ph}(t+\tau) \rangle}{\langle n_{ph}(t) \rangle^2}, \quad (3)$$

where $\langle \rangle$ represents a time average.

In our simulations, the ACF is calculated either after the whole trajectory of the particle has been obtained or in parallel. The software correlator used to compute the ACFs follows the architecture proposed by (26) and described in (25). It has a logarithmic timescale, each channel having an individual sampling time and delay time.

Domains and barriers

Domains are considered to be regions in which the diffusion is free but restricted by barriers. These barriers can represent physical obstacles (cytoskeleton fences) or energy barriers (phase separations). Barriers are considered to be infinitely thin: they are lines that the molecule can cross with a given probability P . The probability P of crossing a barrier is independent of time. External boundaries of the surface A are impermeable. When the molecule hits the external boundaries, it is reflected at the wall.

When the molecule hits a barrier, a number $rand$ is drawn at random between 0 and 1 and compared to the probability P of crossing the barrier. $rand$ is generated by a number generator of Park and Miller with Bays-Durham shuffle and added safeguards, and has a period of $\sim 2 \times 10^9$ (27). If $rand < P$, the barrier is crossed; if not, the molecule remains at its previous position. This condition seems appropriate for biological membranes that are viscous.

Confinement in a permeable domain: definition of the confinement strength

This section aims at defining the input parameters and the associated physical parameters that are relevant to study the transient confinement in domains. In particular, we define the confinement time and the confinement strength, and give their expression as functions of the input parameters.

A circular permeable domain is now embedded in a square area. We define the confinement time τ_{conf} as the average time needed by a molecule placed at the center of the domain to escape from it. We have studied the ratio of the confinement time over the free diffusion time in the domain τ_d^{domain} as a function of P (Fig. 3).

Results can be approximated by a curve of the form:

$$\frac{\tau_{conf}}{\tau_d^{domain}} = A + B \frac{\sigma}{r} \frac{1-P}{P}, \quad (4)$$

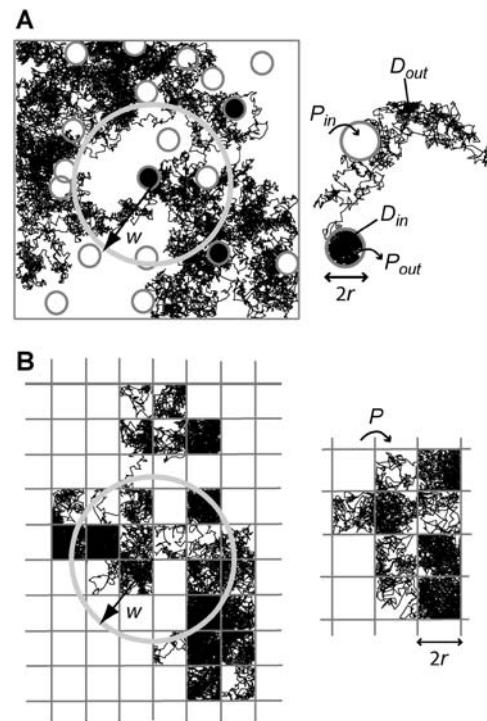


FIGURE 2 Simulated trajectories of a molecule in the cell membrane drawn for two models of confined diffusion. Fluorescence fluctuations arise from the detection volume of size w that is defined by a laser beam. In real optics, the diffraction limit sets in the minimum size w to $w_{min} \sim 190$ nm. (A) Model for isolated microdomains: static circular microdomains of radius r are embedded in a fluid phase. The molecules have a Brownian motion as long as they stay in the same phase. The probabilities of going into and out of the microdomains, P_{in} and P_{out} respectively, can be asymmetric. Here, $r = 100$ nm, $w = 600$ nm, $P_{in} = 0.05$, and $P_{out} = 0.02$. (B) Meshwork model: molecules have to jump over regularly spaced barriers. The molecules have a Brownian motion described by a microscopic diffusion coefficient D_{micro} as long as they stay within the same mesh. The probability that the molecule can cross the barrier is P . Here $r = 100$ nm, $w = 500$ nm, and $P = 0.05$.

where A and B are two positive constants: $A = 1$ (by definition) and $B = 0.95$ (fitted value).

This curve has the same shape as that derived by Saxton for the mean escape time from a corral (12). Nevertheless, different definitions for the escape time and the diffusion time were chosen in Saxton (12), which were more adapted to a single-particle tracking study, leading to different values for the two parameters A and B .

With our definition, parameter A is equal to 1, which means that the confinement time in a domain surrounded by fully permeable barriers is equal to the free diffusion time in the domain. When the probability P of crossing the barrier is < 1 , the confinement time gets longer than the diffusion time. The ratio $\tau_{conf}/\tau_d^{domain}$ is the key parameter expressing the height of the barrier that molecules have to pass. In the following, we will define the confinement strength as $S_{conf} = \tau_{conf}/\tau_d^{domain}$. It has to be noted that this confinement strength is not only a function of P , but also a function of the mean diffusion step length σ and the radius r of the domain (see Eq. 4).

One may wonder if τ_{conf} is an accessible parameter, not only with single-particle analysis, but also from a FCS study. To assess this point, we simulate a FCS experiment with a laser spot centered on the permeable domain. The laser beam waist w is chosen equal to the radius r of the domain, so that the apparent diffusion time τ_d^{app} represents the average time spent by a molecule in the domain. In this case, we found that τ_d^{app} matches

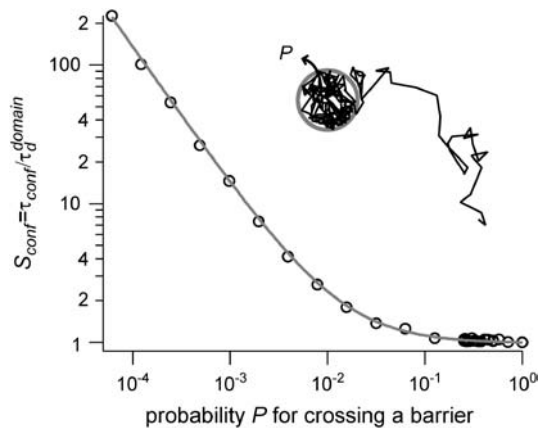


FIGURE 3 Confinement strength of a circular domain as a function of the probability P of crossing the barrier.

τ_{conf} as a function of P . As a result, τ_{conf} is still easy to determine with a FCS analysis.

In the case where the confinement area is a square, the value of the radius of the circle is simply replaced in Eq. 4 by the average length between the center of the square and the side of the square. This length is equal to $(4/\pi) \int_0^{\pi/4} (r/|\cos(\theta)|) d\theta = (4r/\pi) \ln(\sqrt{2} + 1) = 1.1222r$, where θ is the angle that a line from the center of the square makes with one side. Doing the same analysis leads to coefficients $A = 1$ and $B = 1.34$.

Simulations and data analysis

We have implemented the simulations in C++ (Microsoft Visual C++, Version 6.0). They are run on a PC (Pentium III processor). Results have been analyzed and fitted with Igor Pro software (Wavemetrics).

EXPERIMENTAL EVIDENCE: NEED FOR FCS DIFFUSION LAW MEASUREMENTS

To connect our simulations to real experiments, FCS measurements at various spatial scales have been carried out for a lipid and a transmembrane protein inserted in the cell plasma membrane. The experimental results that are explained here have to be considered as a support to our theoretical considerations; they are representative of a large number of experimental results that have been carried out and that will be presented in details in P.-F. Lenne, L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, H. Rigneault, and D. Marguet (unpublished).

This section points out the need for performing FCS diffusion law measurements, instead of the sole study of the shape of the autocorrelation function at a single waist.

Experimental autocorrelation functions

Confocal images of COS-7 cells after staining with fluorescent lipids FL- G_{M1} showed a uniform distribution of the probes in the plasma membrane and a vesicular staining figured by intracellular small dots (Fig. 4 A). Confocal images for TfR-GFP expressing cells (Fig. 4 B) show com-

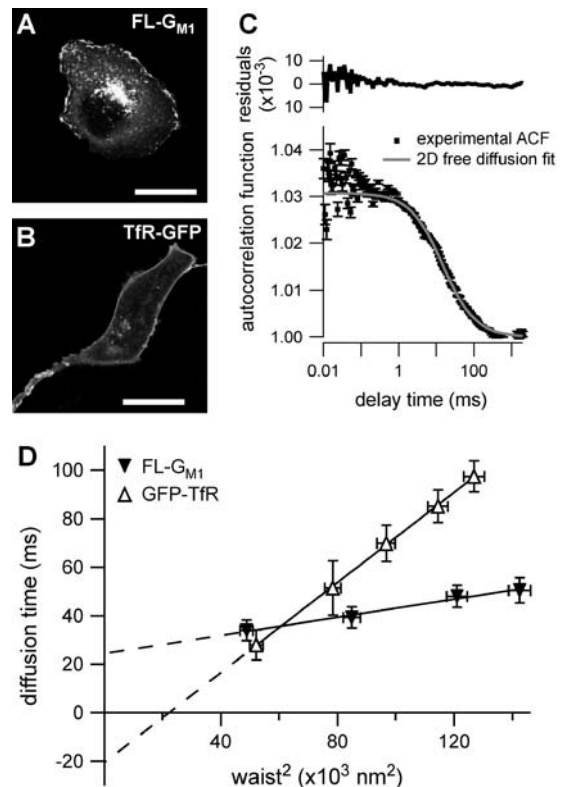


FIGURE 4 Experimental results on COS-7 cells for FL- G_{M1} and TfR-GFP. (A) Confocal image of a cell stained with FL- G_{M1} (scale bar, 20 μm). (B) Confocal image of a TfR-GFP stained cell (scale bar, 20 μm). (C) ACF measured by FCS on FL- G_{M1} stained cells. (D) Experimental FCS diffusion laws obtained for FL- G_{M1} and TfR-GFP. Curves are extrapolated to zero beam waist to make the time intercepts more visible, even if the diffusion law at small waists can be different.

parable intracellular and membrane fluorescence signal distribution.

Fig. 4 C shows the experimental ACF obtained for FL- G_{M1} diffusing in the plasma membrane of COS-7 cells. In this case, fitting the experimental ACF with an anomalous fit leads to an anomalous diffusion coefficient $\alpha \approx 1$. The studied diffusion is therefore not anomalous, which means that the potential trap energies do not vary over a wide range of time and space. Nevertheless, the diffusion of lipids at the cell membrane is certainly constrained, since the measured diffusion time is ~ 10 times longer than the diffusion time of lipids in an artificial membrane (28).

This example shows that fitting the ACF obtained with fluorescent lipids diffusing in the plasma membrane does not permit determination of their diffusion mode. On the contrary, measuring the diffusion time at different sizes of the confocal volume is an interesting way of studying the confinement.

Experimental FCS diffusion law

For an experimentalist, it is possible to vary the waist w by changing the extension of the laser beam falling on the

microscope objective back-aperture. We name “FCS diffusion law” the plot of the apparent diffusion time τ_d^{app} of a membrane component measured by FCS as a function of the square of the waist w^2 . τ_d^{app} is defined as the FWHM of the ACF. We will show that this representation is very fruitful to study the constrained submicron diffusion in the cell membrane.

Although the 1-species free 2D diffusion curve seems to fit nicely the experimental ACFs obtained for FL- G_{M1} and TfR-GFP, the FCS diffusion laws do not reflect free diffusion. Indeed, in both cases the diffusion time is not proportional to the square of the waist w^2 as it is expected for free diffusion, where $\tau_d^\infty = w^2/(4D_{\text{micro}})$, but is an affine function of w^2 ($\tau_d^{\text{app}} = t_0 + bw^2$, with $t_0 \neq 0$). The intersection of the line with the time axis is strictly positive in the case of FL- G_{M1} ($t_0 = 25 \pm 3$ ms), and strictly negative in the case of TfR-GFP ($t_0 = -20 \pm 2$ ms) (Fig. 4 D). Knowing that G_{M1} is a putative raft marker and that TfR could be sensitive to the cytoskeleton through its cytoplasmic tail, these two different FCS diffusion laws may be signatures for two different diffusion processes.

For diffusive processes, it is expected to have a zero diffusion time at zero beam waist. However, the extrapolation of the experimental diffusion curve to zero beam waist can be nonzero independently of the real value of the diffusion time. In the next core section of this study, we will try to explain the two different intercepts and slopes of the measured diffusion laws with two models for the diffusion of membrane constituents. We will also show that these experimental results (free-like ACFs, but FCS diffusion laws that are not normal) are not paradoxical but can indeed reflect diffusion processes in a submicron structured membrane.

SIMULATION RESULTS

To explain the two experimental behaviors that we have shown in the first section, we propose and test different models. First, we give a simple example of total confinement in which a molecule is enclosed in an impermeable box. Then we propose two more refined models to account for i), the diffusion of molecules transiently sequestered in lipid microdomains and ii), the diffusion of molecules hindered by the cytoskeleton meshwork.

Simulated confinement in one impermeable domain

The purpose of this study is to determine how the diffusion behavior of a molecule (as measured by FCS) is sensitive to the presence of impermeable barriers. Moreover, this is useful in determining the minimum size of the simulation area which prevents FCS measurements from boundary effects.

Let us first analyze how ACFs are changed by the confinement of molecules in a single domain with impermeable barriers. We assume a circular domain on the center of which a laser beam is focused. The domain has a radius r and

the waist of the laser beam is w . The key parameter is $X_c = w/r$, which reflects the confinement probed by the laser beam. Fig. 5 A shows autocorrelation functions obtained for different values of r and a fixed value of w . The microscopic diffusion coefficient D_{micro} is kept the same in all these simulations: $D_{\text{micro}} = 10.0 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, $w = 250$ nm, and thus $\tau_d^\infty = 1.56$ ms. Fig. 5 A clearly shows that the so-called apparent diffusion time τ_d^{app} (FWHM of the ACF) does not generally match the free diffusion time τ_d^∞ and depends strongly on the confinement: it decreases when the size of the domain decreases. The decrease of τ_d^{app} is a direct consequence of the reduction of the area available for diffusion, which is not defined anymore by the laser beam extension. In the presence of confinement, a diffusion measurement using FCS should not be made at a single value of the waist, since the diffusion law is not that of free diffusion: it leads practically to an overestimation of D_{micro} when estimated by $D_{\text{micro}} = D_{\text{app}} = w^2/(4\tau_d^{\text{app}})$.

Let us thus assume now that the diffusion law is probed by varying w while the domain size is kept constant. Fig. 5 B shows the variation of τ_d^{app} , with $X_c^2 = w^2/r^2$. Three different regimes are observed. For $X_c^2 < 0.1$, τ_d^{app} increases linearly with X_c^2 as predicted for free diffusion. For intermediate values, $0.1 < X_c^2 < 1$, τ_d^{app} increases more slowly with X_c^2 and

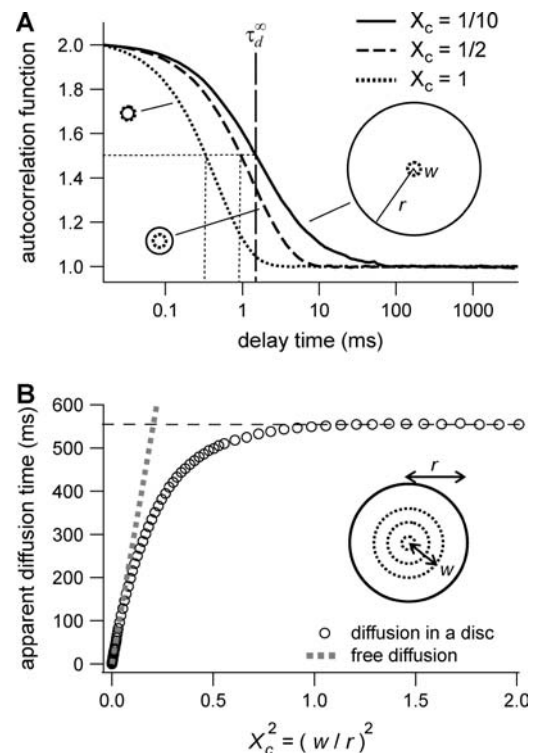


FIGURE 5 Simulation results for a molecule diffusing in a single impermeable domain. (A) ACFs obtained by FCS. Effect of the domain size on the shape of ACFs drawn for three values of the confinement parameter $X_c = w/r$. (B) Apparent diffusion time measured from ACFs as a function of the confinement parameter squared, plotted for a fixed size of the impermeable domain.

deviates from the standard formula. For $X_c^2 > 1$, τ_d^{app} reaches a saturation value. This regime is dominated by a domain size effect: as a further proof, we have verified that the saturation value of τ_d^{app} is proportional to r^2 (data not shown).

It has to be noted that these conclusions can be extended to the case of a square domain of side $2r$. The confinement probed by the laser beam is then defined by $X_c = (\pi/4)^{1/2} w/r$. The proportional coefficient $(\pi/4)^{1/2}$ is chosen so that X_c^2 is still the ratio of the excitation beam surface area (πw^2) over the confinement area ($4r^2$). Here again, the free diffusion regime is only obtained when $X_c^2 < 0.1$.

The shape of the ACF has already been studied in the case of a square domain in Gennerich and Schild (19).

Simulated confinement in multiple microdomains

In the following, we will distinguish between two hindering processes, and propose a model for both of them. First, we will focus our study on isolated circular microdomains, which try to account for lipid microdomains. Then we will study the diffusion of molecules in a meshwork, which is supposed to model the cytoskeleton.

Isolated microdomains

We have modeled rafts as permeable isolated microdomains surrounded by energy barriers. This model should be able to account for lipid rafts as well as other kinds of domains. We have simulated the diffusion of a molecule in a model membrane where microdomains (phase II) are embedded in a larger square surface of phase I (Fig. 2 A). Microdomains are considered as static entities that are separated from phase I by barriers. They can be either periodically or randomly distributed. We assume that domains are identical disks of radius r distributed over the surface. We make the assumption that the microscopic diffusion coefficients in and out of microdomains, respectively $D_{\text{micro}}^{\text{in}}$ and $D_{\text{micro}}^{\text{out}}$, are linked by $D_{\text{micro}}^{\text{out}} = 3D_{\text{micro}}^{\text{in}}$, as it has been previously measured on artificial membranes (29). $D_{\text{micro}}^{\text{in}}$ and $D_{\text{micro}}^{\text{out}}$ stand for the microscopic diffusion coefficients in liquid-ordered and liquid-disordered phases, respectively. In each simulation, the following parameters are chosen: the microscopic diffusion coefficient outside of the domains is $D_{\text{micro}}^{\text{out}} = 3.125 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, and the mean jump length is $\sigma = 5$ nm. The size of the radius of the circular domain is $r = 100$ nm, and the square simulation box A has an area of $100 \mu\text{m}^2$.

Probabilities of going out of or into a microdomain are P_{in} and P_{out} , respectively. If not otherwise stated, these two probabilities have the same value, P . The confinement probed by the laser beam is defined here by $X_c = w/r$. In the following, σ/r is kept constant, so that the confinement strength $S_{\text{conf}} = \tau_{\text{conf}}/\tau_d^{\text{domain}}$ is only a function of the probability P .

Shapes of ACFs obtained for different probabilities P of crossing a barrier. Fig. 6 A shows ACFs which have been obtained for different probabilities of crossing the barriers

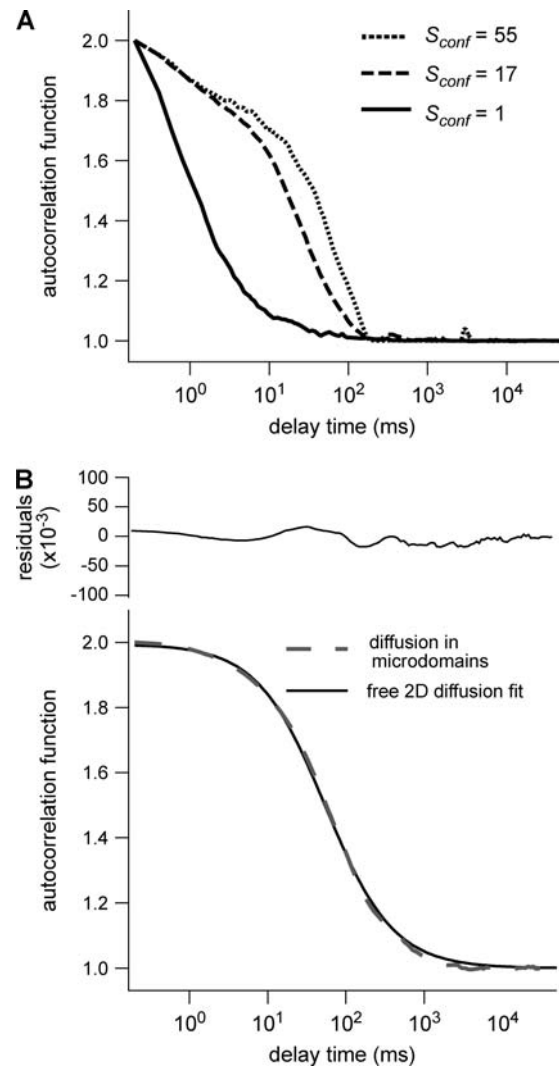


FIGURE 6 Simulated intensity ACFs for a single molecule diffusing in microdomains delimited by permeable barriers. (A) ACFs are calculated for a confinement parameter $X_c^2 = 1$ and for different probabilities P of crossing the barriers. (B) ACF calculated for a confinement parameter $X_c^2 = 16$. It is well fitted by a free 2D diffusion fit.

and for $w = r$, for a laser spot centered on a domain. When P decreases, i.e., when barriers are more impermeable and the confinement strength S_{conf} increases, the diffusion time increases. Two distinct decay times can be observed for high values of S_{conf} and small values of X_c^2 : the short time is related to the diffusion time within a single domain and the longer one is related to the diffusion time through the whole illuminated area. The detection of the first bump is a signature of the presence of a domain that can be on the order of or even smaller (data not shown) than the beam extension (30).

On the contrary, ACFs obtained for large waists ($X_c^2 > 10$) can be quite nicely fitted by a 1-species 2D free diffusion fit (Fig. 6 B).

We put forward τ_d^{app} as an observable of physical meaning that is easy to determine since it does not require the

implementation of a complex fit. By varying w , we can explore FCS diffusion laws by observing τ_d^{app} . It is simply related in the case of free 2D diffusion to the microscopic diffusion coefficient by $\tau_d^{\text{app}} = \tau_d^{\infty} = w^2/(4D_{\text{micro}})$. In the presence of microdomains, we expect a deviation from this law depending in particular on S_{conf} and on the size and density of microdomains.

Diffusion laws for fixed size and density of domains and variable probability P of crossing a barrier. To evaluate the different regimes that a FCS experiment can probe, we have determined the variation of the apparent diffusion time with respect to w (having r fixed). We first plot τ_d^{app} as a function of X_c^2 with the laser spot centered on a microdomain, a density of microdomains $d = 0.5$ and different confinement strengths $S_{\text{conf}} \in \{1, 2, 4, 6, 15\}$ (Fig. 7 A). When $S_{\text{conf}} > 1$, i.e., when the diffusion is not free, three regimes can be distinguished. If $X_c^2 \leq 0.1$, particles appear to diffuse freely, and D_{app} matches $D_{\text{micro}}^{\text{in}}$ (regime i): FCS measurements probe the microscopic diffusion coefficient within the microdomain. A transient regime is observed when $X_c^2 \approx 1$: complex diffusion occurs because of barrier effects (regime ii). Last, when $X_c^2 \geq 10$, τ_d^{app} scales linearly with w^2 (regime iii). However, it differs significantly from regime i: the intersection with the time axis becomes strictly positive and the line slope increases. The positive intercept as well as the slope are increasing functions of the probability S_{conf} .

To be closer to experimental conditions, one averages the values of τ_d^{app} obtained for different positions of the laser spot on the surface of the membrane. Fig. 7 B shows the average value $\overline{\tau_d^{\text{app}}}$ as an affine function of X_c^2 . The first two regimes, i and ii, cannot be distinguished anymore. When $X_c^2 > 10$, $\overline{\tau_d^{\text{app}}}$ is a linear function of w^2 . We find that regime iii is described by the same line as the one obtained when no average is done on the position of the laser waist. In the following, all the diffusion laws will be given with the laser spot centered on one domain. This leads to no change in the

description of regime iii, which is the regime we are mostly interested in, since we expect to have $w/r > \text{few units}$ in experiments. If the sole regime iii is indeed probed experimentally, an upper limit can be given to the microdomain radius since this regime starts at $X_c^2 > 10$.

We also verified that the same regime iii is obtained for periodically and nonperiodically distributed microdomains as long as there is no percolation (data not shown).

Diffusion laws for a fixed size of domains, a fixed probability P of crossing a barrier and various densities of domains. The same study is carried out for densities ranging from 0.1 to the percolation threshold, with a periodical distribution of microdomains.

Fig. 8 A shows that the intercept and the slope of the line describing regime iii are increasing functions of the density d .

Diffusion laws for fixed size and densities of domains and different probabilities P_{in} and P_{out} of entering and exiting a domain. In the following, the study is carried out with $r/\sigma = 30$.

The probability of entering a microdomain may not be the same as the probability of exiting the microdomain. To study this case, the diffusion laws have first been drawn for a fixed probability $P_{\text{out}} = 0.005$ and a variable value of P_{in} (Fig. 8 B).

Regime iii are lines, whatever the value of P_{in} is. The intercepts and the slopes are two increasing functions of P_{in} . They behave as power laws of P_{in} .

The diffusion laws have also been drawn for a fixed probability $P_{\text{in}} = 0.005$ and a variable value of P_{out} (Fig. 8 C). In this case, regime iii is still a line, the intercepts and the slopes being decreasing functions of P_{out} . It can be pointed out that the different simulated diffusion laws obtained for high values of P_{out} ($P_{\text{out}} \geq 0.05$) are approximately the same. These high values of P_{out} lead to a confinement time on the order of the diffusion time in a domain ($S_{\text{conf}} = \tau_{\text{conf}}/\tau_d^{\text{domain}} \approx 1$). These cases correspond to a low confinement of the molecules in the domain, whereas the probability of

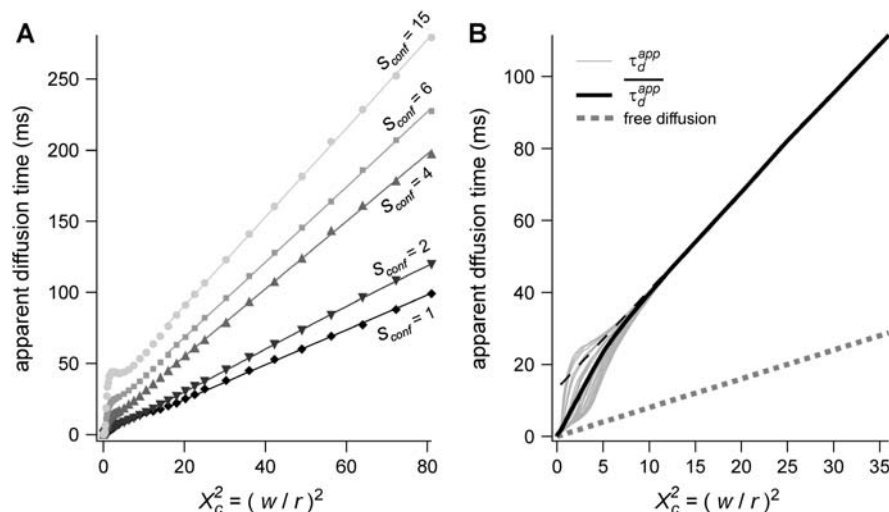


FIGURE 7 Simulated diffusion laws obtained by FCS: the apparent diffusion time measured from ACFs is plotted as a function of the confinement parameter squared X_c^2 . In each case, the chosen probabilities P_{in} and P_{out} are equal. (A) Diffusion laws obtained for five confinement strengths S_{conf} . Here the laser spot is centered on a microdomain. (B) The diffusion law is averaged on all possible positions of the excitation beam for $S_{\text{conf}} = 6$. It is compared to diffusion laws plotted for different positions of the laser spot.

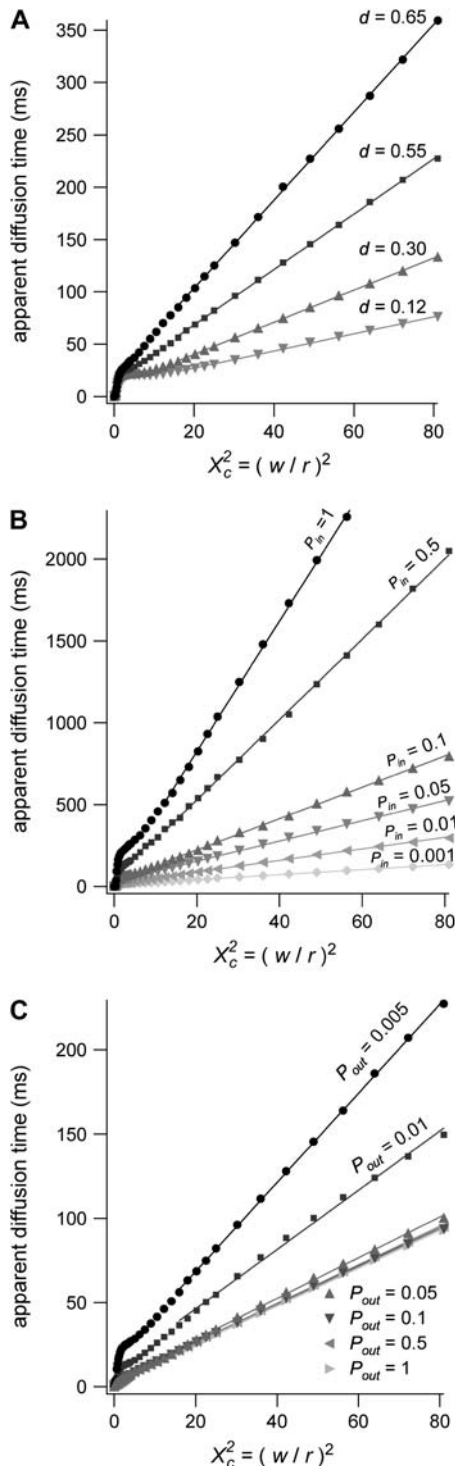


FIGURE 8 Simulated diffusion laws obtained by FCS for the microdomain geometry, when d , P_{in} , or P_{out} are changed. (A) Diffusion laws as a function of the density of microdomains (i.e., as a function of the ratio of the surface of all microdomains over the whole surface A) for $P_{in} = P_{out} = 0.05$. (B) Diffusion laws obtained for different probabilities of going P_{in} into microdomains (for $P_{out} = 0.05$). (C) Diffusion laws obtained for different probabilities P_{out} of going out of microdomains (for $P_{in} = 0.05$).

entering a domain is low: the diffusion law is very close to the one obtained for impermeable obstacles.

Regime iii of the diffusion laws is a line for densities of microdomains ranging from 0.1 to 0.65, and when $0 \leq P_{in} \leq 1$, $0.001 \leq P_{out} \leq 1$, for $r/\sigma = 30$ (which corresponds to confinement strengths ranging from 1 to 15).

Meshwork

We will now show that the diffusion law is different when the molecule diffusion is hindered by a meshwork instead of isolated microdomains. We consider the case of multiple adjacent domains separated by barriers (Fig. 2 B). This situation may be representative of the diffusion of trans-membrane proteins in a cytoskeletal network (e.g., the actin meshwork in COS-7 cells).

For reasons of simplicity, domains are squares separated by straight barriers spaced by a distance of $2r$. In each simulation, the following parameters are chosen: the microscopic diffusion coefficient is $D_{micro} = 3.125 \mu m^2 s^{-1}$, the jump length $\sigma = 5$ nm, and the size of the half-side of the squares $r = 100$ nm.

The confinement probed by the laser beam is defined here by $X_c = (\pi/4)^{1/2} w/r$, with the laser beam centered on a knot of the meshwork.

Fixed size of confinement and variable probability P of crossing the barrier. Fig. 9 A shows ACFs obtained for a fixed illumination laser waist and for different values of S_{conf} , corresponding to different values of P , since σ/r is kept constant.

As for isolated microdomains, the apparent diffusion time increases when P decreases, and two decay times are obtained for large confinement strengths and small values of X_c ($X_c^2 \approx$ few units, depending on the confinement strength). Moreover, ACFs obtained for large waists ($X_c^2 >$ few units) are well fitted by a 1-species 2D free-diffusion fit (Fig. 9 B). As in the case of isolated microdomains, study of the shape of the ACF does not give any information on the diffusion mode if the area of the focal spot is more than a few times larger than the area of a single mesh.

Apparent diffusion time when w varies. Fig. 10 A shows τ_d^{app} as a function of X_c^2 for different values of S_{conf} : $S_{conf} \in \{1, 4, 17, 55\}$. As expected, τ_d^{app} matches τ_d^∞ when $X_c^2 < 2$. For intermediate values of X_c^2 , i.e., $X_c^2 \approx 2$, a short transition regime is observed. When $X_c^2 > 2$, τ_d^{app} is a linear function of X_c^2 : its slope is dependent on S_{conf} and the intersection with the time axis is negative. The slope and the absolute value of the intersection with the time axis are two increasing functions of the confinement strength S_{conf} . Fig. 10 B shows the average value $\overline{\tau_d^{app}}$ as a function of X_c^2 for $S_{conf} = 7$. The first two regimes i and ii cannot be distinguished anymore in the case of isolated microdomains. When $X_c^2 > 5$, $\overline{\tau_d^{app}}$ is the same linear function of w^2 as the one obtained when no average is done on the position of the laser waist.

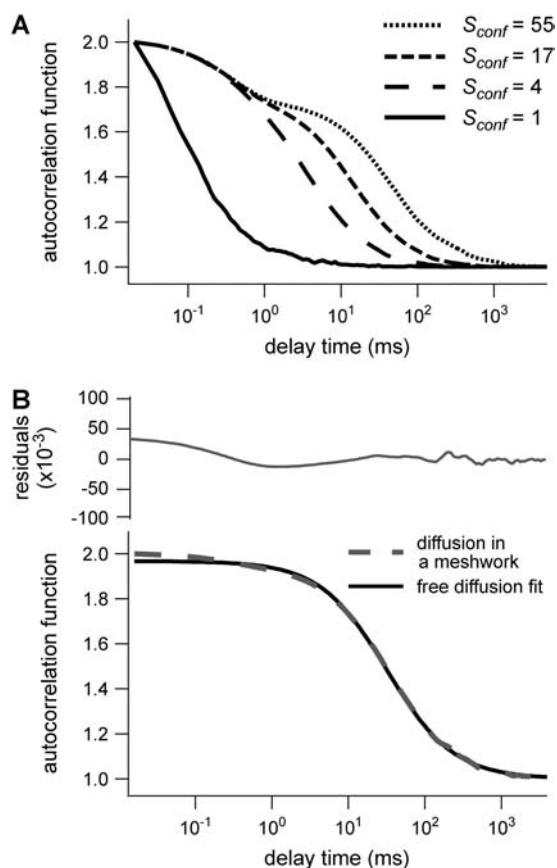


FIGURE 9 Simulated results obtained by FCS for permeable meshwork geometry. (A) ACFs are calculated for a confinement parameter $X_c^2 = 4$ and for different probabilities P of crossing the barriers. Effect of the confinement strength on the shape of ACFs. (B) ACF calculated for a confinement parameter $X_c^2 = 16$. It is well fitted by a 2D free diffusion fit.

DISCUSSION

The major applications of FCS are measurements of diffusion coefficients D (31,32). For free diffusion, the standard treatment of FCS data, which consists in fitting ACFs measured at a single size of the waist, is well adapted to determine D . However, a large number of membrane proteins and lipids are partially confined in substructures of sizes ranging from tens of nanometers to micrometers; some are impeded by the cytoskeleton, some others are thought to be raft-associated (33,34). Although sophisticated fits can give some clues on the mode of diffusion in some specific cases, we have shown here that the FCS approach can be revisited to understand diffusion in membranes and to allow inferences on membrane structures. We have introduced the “FCS diffusion law” concept that requires performing several FCS measurements for different sizes of the observation volume, a parameter defined by the transverse laser waist w and can be easily changed in a FCS setup by underfilling the microscope objective back-aperture. With such a technique, we have easily performed measurements for waists w

ranging from 200 nm to 400 nm, which corresponds to a fourfold increase of X_c^2 .

The determination of the apparent diffusion time τ_d^{app} for different values of w permits one to infer the process of diffusion; in particular, we emphasize that τ_d^{app} can bring information on the confinement. Fig. 11 summarizes our different results and is presented as a guide for discussion.

When the size of w is small with respect to the domain size ($X_c^2 \leq 0.1$ (regime i)), the diffusion appears to be free: the size of the beam does not permit probing the complexity of the system (either skeletal corrals or isolated microdomains). On the other hand, FCS can then give access to microscopic diffusion coefficients and will be sensitive to heterogeneities: it can be used to determine a two-dimension map of microscopic diffusion coefficients. For laser waists comparable to the size of the domains ($X_c^2 \approx 1$ (regime ii)), a transitional diffusion regime is observed. In this regime and for a small probability of crossing the barriers, we expect to detect confinement by a noticeable change of ACFs, which exhibit two different decay times associated respectively to diffusion through the domain and the observation volume (see Figs. 6 A and 9 A). For laser waists larger than the size of the domains ($X_c^2 > 10$ for isolated domains and $X_c^2 > 2$ for a meshwork (regime iii)), diffusion is normal again, with an apparent diffusion coefficient D_{eff} depending on the probability of crossing the barriers, the microscopic diffusion coefficients, and the density of domains (in the case of isolated microdomains). This regime can be approximated by a function of the form

$$\tau_d^{app} = t_0 + \frac{1}{4D_{eff}}w^2, \quad (5)$$

where t_0 and D_{eff} are two constants. Interestingly, in simulations, t_0 is positive for diffusion in isolated microdomains and negative for corrals.

Phenomenological models for the regime iii of the FCS diffusion law obtained in rafts and corrals

Regime iii is of particular interest since it corresponds to the experimental case when the size of the microdomains is a few times smaller than the diffraction limit. In this section, we focus on the interpretation of parameters t_0 and D_{eff} (Eq. 5) that are easily deduced from the FCS diffusion laws in this regime.

Diffusion laws in microdomains as a function of the molecular partition inside microdomains

We have shown that the intercept t_0 and the slope $1/(4D_{eff})$ of these lines depend on parameters such as the density and the probabilities of entering or exiting microdomains. They also depend on the diffusion coefficients inside and outside microdomains.

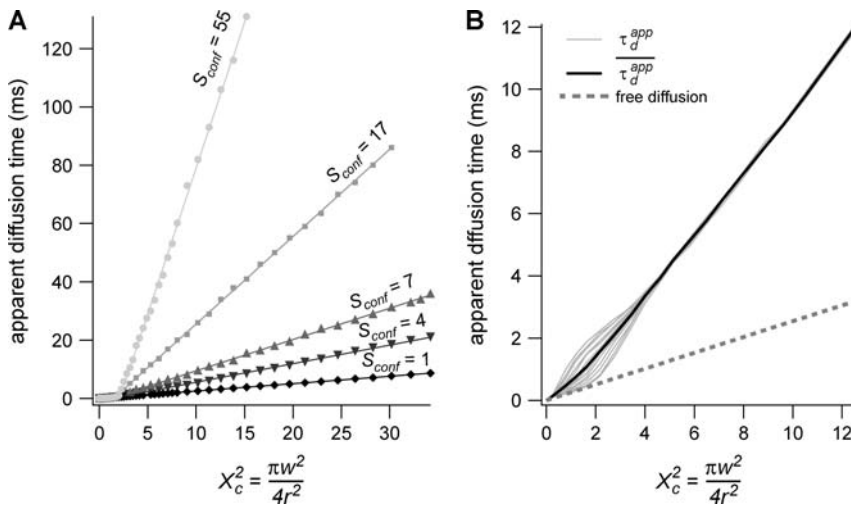


FIGURE 10 (A) Diffusion laws obtained for five confinement strengths S_{conf} , and a single position of the excitation beam (the laser spot is centered on a knot of the meshwork). (B) The diffusion law is averaged on all possible positions of the excitation beam (for $S_{\text{conf}} = 7$). It is compared to diffusion laws plotted for different positions of the laser spot.

Nevertheless, more physical parameters are needed to explain the experimental FCS diffusion laws.

The partition coefficient α of molecules into raft microdomains can be evaluated independently through biochemical studies. The partition coefficient α corresponds to the ratio measured at a given instant of molecules of a certain kind that are inside microdomains over all molecules of this kind. It can also be calculated with our simulations, since the duration of the whole simulated trajectory is much longer than the time needed for the molecule to visit all the allowed points of the state-space (ergodic principle). Hence, α is obtained from the simulated trajectory by calculating the time the molecule spends in microdomains over the whole simulation time.

In the Appendix, we show that the time intercept t_0 can be quite well described by a function of α and the confinement time

$$t_0 \approx 2\alpha(\tau_{\text{conf}} - \tau_{\text{d}}^{\text{domain}}). \quad (6)$$

Since α can be measured from biochemical studies, one can now evaluate the confinement time in a single micro-

domain τ_{conf} under the usually admitted assumption that $\tau_{\text{conf}} \gg \tau_{\text{d}}^{\text{domain}}$.

To go further, we give now a possible expression for the slope $1/(4D_{\text{eff}})$ of the line describing the regime iii: the total time needed by a molecule to diffuse through the focal spot is the sum of the time it is confined in microdomains and t_{free} the time it is not being confined. In this case, one can write $\tau_{\text{d}}^{\text{app}} = N\tau_{\text{conf}} + t_{\text{free}}$, with N the average number of domains that are being crossed.

But as mentioned before, the partition is defined (in the time description) by the time a molecule spends in microdomains over the total diffusion time, which can be written as $\alpha = N\tau_{\text{conf}}/\tau_{\text{d}}^{\text{app}}$.

This leads to $\tau_{\text{d}}^{\text{app}} = t_{\text{free}}/(1 - \alpha)$, which is equivalent to $D_{\text{eff}} = (1 - \alpha)D_{\text{free}}$ in terms of diffusion coefficients.

If molecules enter easily in microdomains, which is the case if the partition is $\sim > 0.5$, D_{free} is equal to D_{out} . If molecules do not enter easily in microdomains, which is the case if the partition is $\sim < 0.5$, they diffuse among microdomains as if they were impermeable obstacles and D_{free} is equal to D_{obst} , which is the effective diffusion coefficient among impermeable obstacles. An expression of D_{obst} in terms of the surface density covered by the obstacles is given in the Appendix.

As a consequence, this leads to the following expression for the effective diffusion coefficient in the presence of permeable microdomains:

$$D_{\text{eff}} = \begin{cases} (1 - \alpha)D_{\text{obst}} & \text{if } \alpha < 0.5 \\ (1 - \alpha)D_{\text{out}} & \text{if } \alpha > 0.5 \end{cases} \quad (7)$$

Diffusion laws in a meshwork as a function of the confinement strength

In all diffusion simulations in a meshwork, the particle visits a certain number of meshes during its diffusion in the confocal volume. The average number N of meshes that are

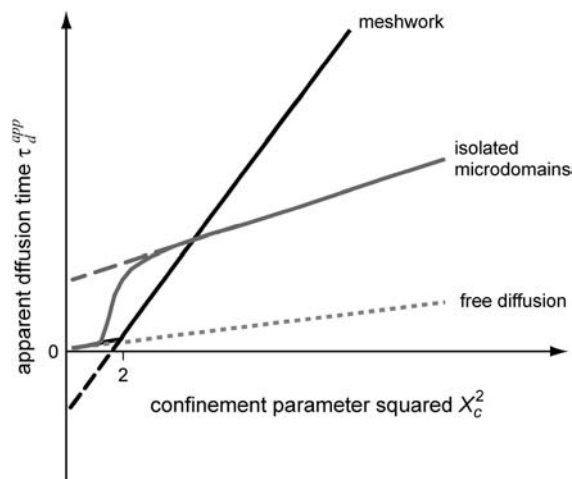


FIGURE 11 Apparent diffusion time with respect to X_c^2 for different geometries of diffusion.

crossed is only a function of the waist of the focal spot, not of the probability of passing a barrier. The mean diffusion time through the focal spot is equal to the number of crossed meshes multiplied by the confinement time in a single mesh so that $\tau_d^{\text{app}} = N\tau_{\text{conf}} = NS_{\text{conf}}\tau_d^{\text{domain}}$. In the case of free diffusion, the diffusion time in the focal spot is given by the number of crossed meshes multiplied by the diffusion time in a single mesh: $\tau_d^{\infty} = N\tau_d^{\text{domain}} = w^2/(4D_{\text{micro}})$. As a consequence, the asymptotic diffusion law needs to be a line with a slope equal to $S_{\text{conf}}/4D_{\text{micro}}$. For spatial scales much smaller than the mesh size, one expects to obtain a free diffusion law, i.e., a line with a slope equal to $1/4D_{\text{micro}}$. Finally, the spatial scale at which regime ii and regime iii cross should be close to the mesh size. It can be seen from the simulated FCS diffusion laws that the crossover is found for $X_c^2 \approx 2$. The actual FCS diffusion law can be calculated from the slopes derived from this intuitive model, and the crossover obtained from the simulations; we find

$$t_d = \begin{cases} \frac{w^2}{4D_{\text{micro}}} & \text{if } X_c^2 < 2 \\ S_{\text{conf}} \frac{w^2}{4D_{\text{micro}}} + k(\tau_d^{\text{domain}} - \tau_{\text{conf}}) & \text{if } X_c^2 > 2 \end{cases} \quad (8)$$

with $k = 8/(\pi \times 1.122^2) \approx 2$.

These equations fit quite nicely the FCS diffusion laws obtained from the simulations (data not shown). Note that the determination of the crossover point provides a measure of the mesh size.

Interpretation of the experimental results

Diffusion modes encountered in COS-7 cells

To end up our discussion, we now come back on the experimental results that have been presented in Fig. 4. In the framework of our model, the diffusion modes of both the FL- G_{M1} and the TfR-GFP can now be inferred from the shapes of the measured FCS diffusion laws. For FL- G_{M1} , the large waists diffusion law (regime iii) can be fitted by a line with a positive intercept. This diffusion law is well described by the microdomain model. This can be related to the fact that FL- G_{M1} is a putative raft marker, which means that biochemical studies show that it partitions into rafts.

For TfR-GFP, the large waists diffusion law (regime iii) is a line with a negative intercept, which is compatible with a diffusion hindered by the cytoskeleton meshwork.

Confinement time values

Through biochemical studies, it has been shown that 40% of G_{M1} partition into detergent resistant membranes (35,36), whereas its fluorescent analog FL- G_{M1} is expected to have a much smaller partition coefficient (37). Thus, a lower limit of the confinement time into microdomains can be inferred from the partition α and the intercept t_0 : $\tau_{\text{conf}} - \tau_d^{\text{domain}} \geq 30 \pm 10$ ms.

An upper limit can be given to the microdomain radius, because the sole affine regime (iii) is observed experimentally. Since this regime corresponds to $X_c^2 > 10$ and the experimental waist is >200 nm (diffraction-limited), the maximum value for the microdomain radius should be ~ 60 nm. Moreover, at a waist of 200 nm, we measured a diffusion time of 30 ms. Thus, the diffusion time through a domain would be at most 3 ms. The time intercept being much larger than this time, we can conclude that $\tau_{\text{conf}} \gg \tau_{\text{diff}}$ and $\tau_{\text{conf}} \geq 30 \pm 13$ ms.

The confinement time in a mesh of the cytoskeleton can also be calculated from the negative time intercept of TfR-GFP diffusion law, since $\tau_{\text{conf}} - \tau_d^{\text{domain}} = 10 \pm 1$ ms.

As mentioned before, these two diffusion examples are representative of some more experimental results that will be presented in detail in Lenne et al. (unpublished).

CONCLUSION

Because FCS has a high temporal resolution, it can easily capture millisecond range phenomena, in particular transient confinements, which are difficult to study with other techniques. In this article, we have shown that the ‘‘FCS diffusion laws’’, which are obtained by FCS measurements at various spatial scales, give valuable information on the diffusion processes taking place in the membranes. The shape of such FCS diffusion laws distinguishes between two different diffusion modes: diffusion among isolated microdomains (as for FL- G_{M1}) and diffusion hindered by a meshwork (as for TfR-GFP). In the regime where the laser waist w is much larger than the domain or mesh extension, we have demonstrated that the FCS diffusion laws can provide physical parameters such as the residence time into a single microdomain or mesh and an effective diffusion coefficient. Furthermore, we have shown that the FCS diffusion laws split in various regimes depending on the ratio of the waist w over the size of the microdomains (or meshes). The validity of the models has been extensively tested in membranes of live cells (more examples are given and exploited in Lenne et al. (unpublished)). These results show that FCS diffusion laws are relevant to study confinement and permit inferences about the dynamic organization of the cell membrane. We hope that these ‘‘FCS diffusion laws’’ will constitute a framework to study complex diffusion in model systems and membranes of live cells.

From a biological point of view, this will unravel the relationship between molecular confinement and biological functions such as signaling processes. From a physical point of view, this offers a new tool to study the transition from anomalous to normal diffusion (38).

APPENDIX: EFFECTIVE DIFFUSION COEFFICIENT AND TIME INTERCEPT FOR THE MICRODOMAIN MODEL

When domains are fully impermeable and molecules are restricted to diffuse outside of them, the diffusion law in regime iii is a line with a null intercept, which gives an effective diffusion coefficient D_{obst} :

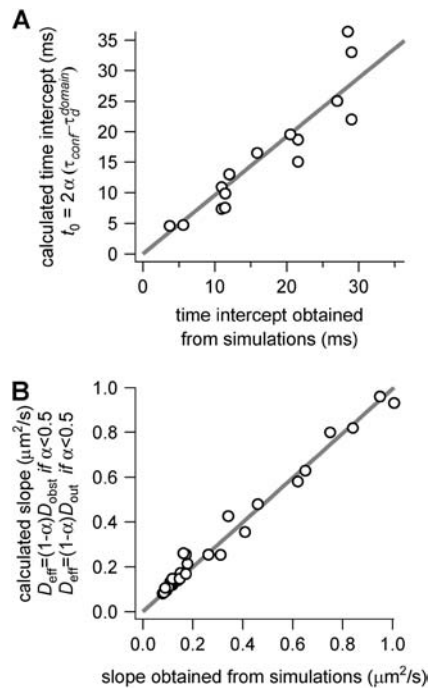


FIGURE 12 Parameters of the line describing regime iii of molecules in isolated domains geometry. (A) Time intercept t_0 as calculated by Eq. 6 versus the time intercept obtained from the simulations. (B) Slope $1/(4D_{eff})$ calculated by Eq. 7 as a function of the slope obtained from the simulations.

$$D_{obs} = f(d)D_{out},$$

where $f(d)$ is a function of the surface density d covered by the obstacles. In the case of periodically distributed impermeable circular obstacles and for $0.1 < d < 0.6$, we obtain from fit $f(d) = (1 - d)/(1 - 0.6d)$ (data not shown).

To confront our heuristic model with the simulation results, we compare the calculated time intercept and slope given by Eqs. 6 and 7 with those obtained from our simulations. Fig. 12 shows that both the time intercept and the effective diffusion coefficient are very well described by Eqs. 6 and 7.

We thank H. Qasmi and N. Bertaux for technical help in simulations and P. Pelcé for helpful discussions.

This work was supported by institutional grants from the Centre National de la Recherche Scientifique and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and by specific grants from the Fondation pour la Recherche Médicale, Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and Centre National de la Recherche Scientifique. L.W. is recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Jacobson, K., E. D. Sheets, and R. Simson. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*. 268:1441–1442.
- Kusumi, A., Y. Sako, and M. Yamamoto. 1993. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* 65:2021–2040.
- Fujiwara, T., K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, and A. Kusumi. 2002. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* 157:1071–1081.
- Singer, S. J., and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720–731.
- Brown, D. A., and J. K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 68:533–544.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 387:569–572.
- Brown, D. A., and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275:17221–17224.
- Varma, R., and S. Mayor. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*. 394:798–801.
- Saxton, M. J., and K. Jacobson. 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:373–399.
- Schutz, G. J., G. Kada, V. P. Pastushenko, and H. Schindler. 2000. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 19:892–901.
- Pralle, A., P. Keller, E. L. Florin, K. Simons, and J. K. Horber. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* 148:997–1008.
- Saxton, M. J. 1995. Single-particle tracking: effects of corrals. *Biophys. J.* 69:389–398.
- Weiss, M., H. Hashimoto, and T. Nilsson. 2003. Anomalous protein diffusion in living cells as seen by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 84:4043–4052.
- Wawrezinieck, L., P.-F. Lenne, D. Marguet, and H. Rigneault. 2004. Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws: application to live cell membranes. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 5462:92–103.
- Masuda, A., K. Ushida, and T. Okamoto. 2003. Japanese Patent Application. (Published as Japanese Patent Publication No. 2005–043278, Feb. 17, 2005). Tokyo, Japan.
- Masuda, A., K. Ushida, and T. Okamoto. 2005. New fluorescence correlation spectroscopy enabling direct observation of spatiotemporal dependence of diffusion constants as an evidence of anomalous transport in extracellular matrices. *Biophys. J.* 88:3584–3591.
- Schwille, P. 2001. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochem. Biophys.* 34:383–408.
- Gennerich, A., and D. Schild. 2002. Anisotropic diffusion in mitral cell dendrites revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 83:510–522.
- Gennerich, A., and D. Schild. 2000. Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used. *Biophys. J.* 79:3294–3306.
- Pagano, R. E., and O. C. Martin. 1998. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, San Diego, CA.
- Elson, E. L., and D. Magde. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. *Biopolymers*. 13:1–27.
- Bouchaud, J. P., and A. Georges. 1990. Anomalous diffusion in disordered media: statistical mechanisms, models and physical applications. *Phys. Rep.* 195:127–293.
- Yechiel, E., and M. Edidin. 1987. Micrometer-scale domains in fibroblast plasma membranes. *J. Cell Biol.* 105:755–760.
- Lopez, A., L. Dupou, A. Altibelli, J. Trotard, and J. F. Tocanne. 1988. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. Critical comparison of analytical solutions, and a new mathematical method for calculation of diffusion coefficient D . *Biophys. J.* 53:963–970.
- Wohland, T., R. Rigler, and H. Vogel. 2001. The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 80:2987–2999.

26. Schätzel, K. 1985. New concepts in correlator design. *In* Institute of Physics Conference Series. Hilger, London. 77:175–184.
27. Press, W. H., S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery. 1992. Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
28. Fahey, P. F., D. E. Koppel, L. S. Barak, D. E. Wolf, E. L. Elson, and W. W. Webb. 1977. Lateral diffusion in planar lipid bilayers. *Science*. 195:305–306.
29. Dietrich, C., L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, and E. Gratton. 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* 80:1417–1428.
30. Lenne, P.-F., E. Etienne, and H. Rigneault. 2002. Subwavelength patterns and high detection efficiency in fluorescence correlation spectroscopy using photonic structures. *Appl. Phys. Lett.* 80:4106–4108.
31. Hess, S. T., S. Huang, A. A. Heikal, and W. W. Webb. 2002. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry*. 41:697–705.
32. Schwille, P., U. Haupts, S. Maiti, and W. W. Webb. 1999. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J.* 77:2251–2265.
33. Kusumi, A., C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:351–378.
34. Simson, R., B. Yang, S. E. Moore, P. Doherty, F. S. Walsh, and K. A. Jacobson. 1998. Structural mosaicism on the submicron scale in the plasma membrane. *Biophys. J.* 74:297–308.
35. Fra, A. M., E. Williamson, K. Simons, and R. G. Parton. 1994. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J. Biol. Chem.* 269:30745–30748.
36. Blank, N., C. Gabler, M. Schiller, M. Kriegel, J. R. Kalden, and H. M. Lorenz. 2002. A fast, simple and sensitive method for the detection and quantification of detergent-resistant membranes. *J. Immunol. Methods*. 271:25–35.
37. Kuerschner, L., C. S. Ejsing, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. I. Anderson, and C. Thiele. 2005. Polyene-lipids: a new tool to image lipids. *Nat. Methods*. 2:39–45.
38. Saxton, M. J. 1996. Anomalous diffusion due to binding: a Monte Carlo study. *Biophys. J.* 70:1250–1262.

4.2 Réflexions sur la diffusion dans des domaines isolés

Cette procédure pourrait laisser penser que nos résultats expérimentaux dépendent largement de nos simulations. On ne peut certes écarter l'hypothèse selon laquelle plusieurs modèles de comportements diffusifs peuvent conduire à la même forme de lois de diffusion FCS. Il est néanmoins possible qu'une telle méthode puisse nous permettre de distinguer entre les différents modèles de structuration de la membrane cellulaire qui ont été décrits dans le chapitre 1. Il sera ensuite toujours possible d'affiner le modèle de membrane afin d'expliquer au mieux les résultats expérimentaux.

Il est important de comprendre que la partition des molécules telle qu'elle est définie (et mesurée ?) par la biochimie n'est pas directement corrélée avec la valeur de l'ordonnée à l'origine mesurée par FCS. En effet, la mesure de la partition renseigne sur le rapport entre le nombre moyen de molécules d'une certaine sorte présentes à un instant donné t dans les domaines sur le nombre total de molécules de cette sorte. Ce rapport n'a pas de lien direct avec le temps que les molécules restent dans une structure donnée. Elles peuvent notamment être nombreuses en moyenne dans les domaines à un instant t si elles rentrent facilement, et même si elles ne restent pas très longtemps...

Les analyses biochimiques donnent une image statique de la membrane. En complément de ces analyses biochimiques, l'étude FCS peut en donner une image dynamique. La mesure de τ_{conf} permet de savoir en effet si chaque molécule reste longtemps dans un domaine, alors que t_0 mélange les informations statiques et dynamiques. En particulier, les molécules peuvent :

- aller souvent dans un domaine (grand P_{in}) et en sortir rapidement (grand P_{out}) ;
- aller souvent dans un domaine (grand P_{in}) et y rester longtemps (petit P_{out}) ;
- aller peu souvent dans un domaine (petit P_{in}) et y rester longtemps (petit P_{out}) ;
- aller peu souvent dans un domaine (petit P_{in}) et en sortir rapidement (grand P_{out}).

On obtiendra un grand coefficient de partition α si le rapport $P_{\text{in}}/P_{\text{out}}$ est grand, ou si la densité de domaines d est grande.

On obtiendra un temps de confinement τ_{conf} élevé si et seulement si la probabilité de sortie P_{out} est petite.

Il est possible de donner un sens physique au paramètre t_0 que nous appellerons par la suite *indice de confinement*. Développons ce concept dans le cas particulier où il n'existe que des domaines isolés.

On pourra dire qu'il y a confinement d'un type de molécule dans les radeaux lipidiques si et seulement si le temps t_0 est supérieur à l'erreur réalisée sur l'ordonnée à l'origine. Une ordonnée à l'origine non nulle peut être mesurée uniquement si le temps de confinement τ_{conf} est suffisamment supérieur au temps de diffusion dans un domaine $\tau_{\text{d}}^{\text{domain}}$ (car $\alpha < 1$).

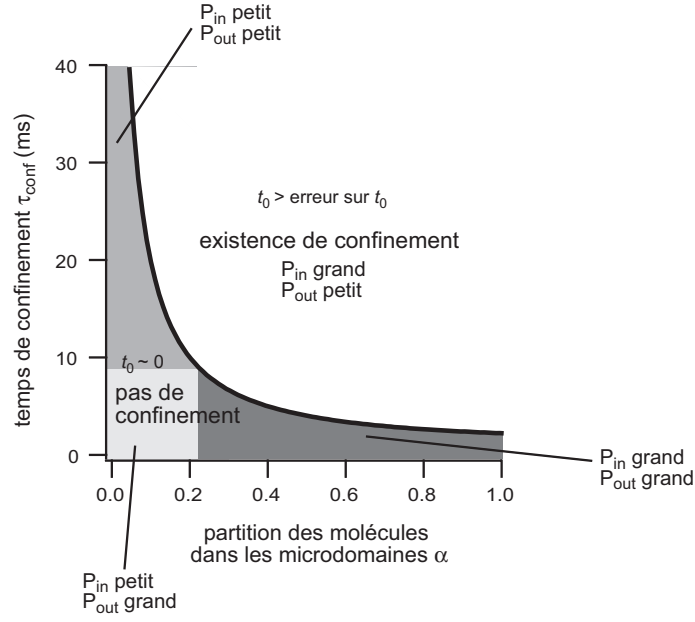


FIG. 4.1 – Introduction de la notion d'indice de confinement.

On considère qu'il y a confinement dès lors que l'ordonnée à l'origine (i.e. l'indice de confinement) est plus grand que la barre d'erreur sur l'ordonnée à l'origine.

On peut noter que l'obtention d'une ordonnée à l'origine environ égale à zéro (c'est-à-dire plus petite que l'erreur réalisée sur t_0) peut correspondre à plusieurs cas :

1. Si $\alpha \ll 1$, c'est-à-dire si les molécules ne rentrent presque jamais dans les domaines isolés, qui sont presque des obstacles imperméables. Dans ce cas, il est impossible d'évaluer τ_{conf} . C'est le cas où on obtient le moins d'information.
2. Si τ_{conf} est de l'ordre de $\tau_{\text{d}}^{\text{domain}}$, c'est-à-dire si les molécules sortent aisément des domaines isolés (i.e. P_{out} est grand).
 - Si de plus $0,5 < \alpha \leq 1$, tout se passe comme si les domaines étaient transparents à la diffusion moléculaire : la diffusion s'approche de la diffusion libre.
 - Si au contraire $\alpha < 0,5$, l'entrée des molécules dans les domaines est difficile, mais les domaines ne piègent pas les molécules qui y entrent.

Chapitre 5

Résultats expérimentaux

Sommaire

5.1	Globules rouges	128
5.1.1	Méthode de travail	128
5.1.2	Forme des fonctions d'autocorrélation	130
5.1.3	Lois de diffusion FCS mesurées sur globules rouges non traités	130
5.1.4	Traitements du cytosquelette de spectrine	132
	Traitement par un antibiotique polyénique : l'amphotéri-	
	cine B et la nystatine	132
	Incubation à 49°C	133
	Résultats pour FL-MA	133
	Résultats pour les lipides FL-G _{M1} , FL-SM et FL-PC	134
5.1.5	Absence de domaines isolés. Rôle du cytosquelette de spec-	
	trine.	134
	Aucun confinement de type microdomaines isolés n'est me-	
	suré dans les globules rouges	134
	FL-MA semble confiné transitoirement dans les mailles du	
	réseau du cytosquelette de spectrine	134
5.1.6	Le photoblanchiment mesuré dans les globules rouges	136
5.2	Cellules eucaryotes à l'état d'équilibre : travail sur les	
	cellules COS-7	137
5.2.1	Lois de diffusion FCS mesurées dans les cellules eucaryotes	
	COS-7 : article paru dans EMBO Journal	137
5.2.2	Le photoblanchiment mesuré dans les cellules COS-7	152
5.2.3	Effet de la température	153
5.2.4	Effet du crosslinking de G _{M1}	155
	La sous-unité B de la toxine du choléra	155
	Expériences réalisées sur G _{M1} et GPI	155
5.2.5	Échange ou confinement ?	157
5.3	Cellules eucaryotes après un événement de signalisation	159
5.3.1	Mesures de lois de diffusion FCS en l'absence d'activation	162
	Cellules 3A9	162

Cellules Jurkat	165
5.3.2 Mesures de lois de diffusion FCS lors de l'activation	167
Cellules 3A9	167
Cellules Jurkat	169
Le confinement total : une piste pour une interprétation de ces résultats expérimentaux	171

5.1 Globules rouges

Ces travaux sur la diffusion de lipides et protéines dans la membrane de l'érythrocyte nous permettront de comparer les résultats obtenus avec notre méthode d'analyse avec ceux obtenus par SPT par l'équipe de Kusumi (voir section 1.3.2). La description de la structure de la membrane du globule rouge a été réalisée dans cette même section.

Nous étudions la diffusion dans la membrane érythrocytaire de trois analogues lipidiques fluorescents : Bodipy- G_{M1} (FL- G_{M1}), Bodipy- C_5 -SM (FL-SM) et Bodipy-PC (FL-PC), ainsi que la diffusion de Bodipy-maléimide (notée FL-MA). Il a été démontré que l'analogue fluorescent Éosine-5-maléimide se fixe de façon spécifique et covalente sur l'acide aminé Lys430 de la protéine bande 3, avec un ratio molaire 1 : 1 [Liu 93]. Il est donc possible d'étudier la dynamique de la bande 3 en mettant au préalable le globule rouge en contact avec Bodipy-maléimide. Nous utilisons le fluorophore Bodipy plutôt que l'Éosine car c'est ce même fluorophore que nous utiliserons par la suite. La structure des analogues fluorescents utilisés est présentée sur la figure 5.1.

5.1.1 Méthode de travail utilisée pour l'étude de la diffusion dans les globules rouges

Les protocoles expérimentaux du prélèvement des globules rouges, de la réalisation du milieu de conservation ainsi que du marquage fluorescent sont décrits dans l'annexe B.

Les analogues lipidiques fluorescents sont insérés dans la membrane lipidique du globule rouge de la même façon que pour les cellules eucaryotes, c'est-à-dire par échange lipidique grâce à la BSA (voir la section A.2.1). Le protocole de marquage de la bande 3 par FL-MA est décrit dans B.3.

La forme des globules rouges diffère selon que le milieu est isotonique, hypertonique ou hypotonique (figure 5.2).

Nous travaillons sur des globules rouges ayant une forme relativement ronde, afin de ne pas modifier les résultats des mesures de diffusion par une surface de diffusion non assimilable à un plan à l'intérieur du volume confocal.

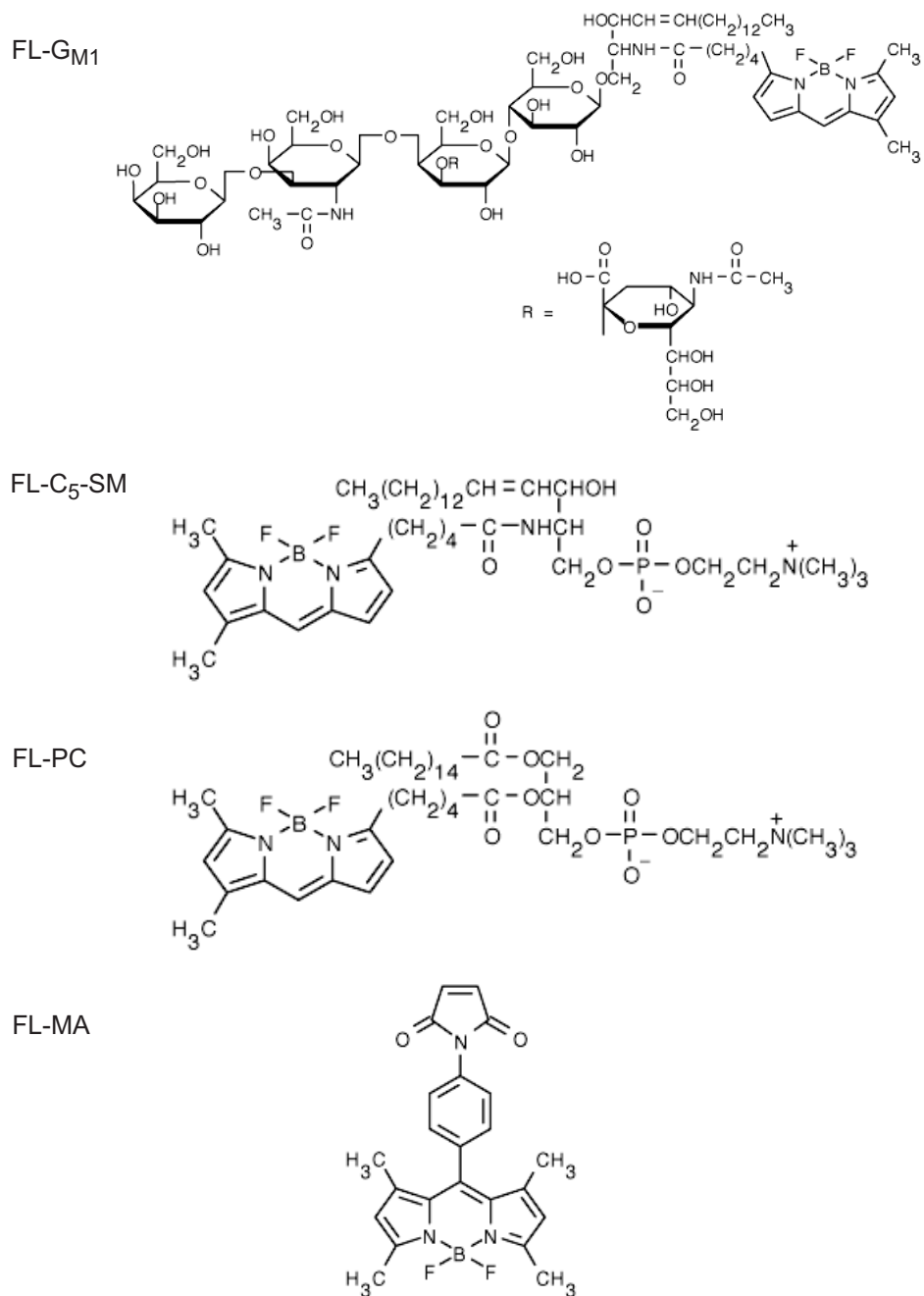


FIG. 5.1 – Structure des analogues fluorescents utilisés pour l'étude des globules rouges

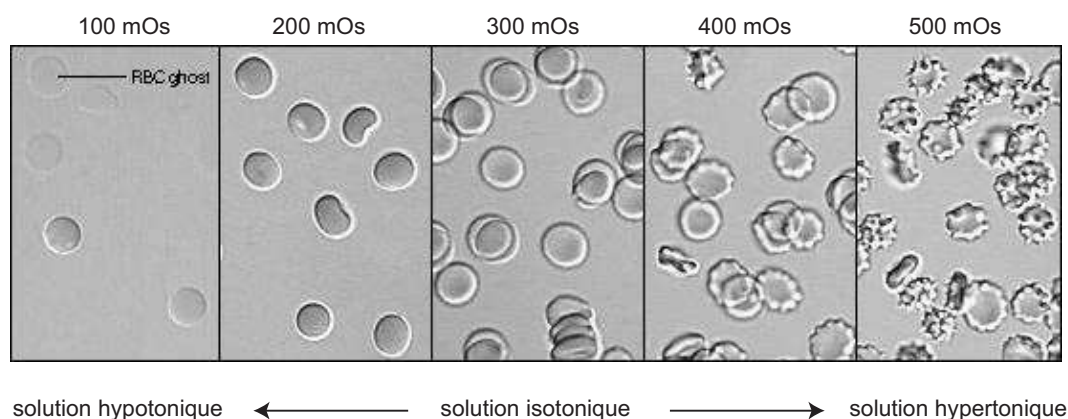


FIG. 5.2 – Effet de l’osmolarité de la solution dans laquelle sont immergés les globules rouges sur leur forme.

Dans une solution isotonique, les globules rouges ont la forme d’un discoïde biconcave. Dans une solution hypotonique, l’eau a tendance à entrer dans la cellule. Les cellules perdent leur forme biconcave et s’arrondissent ; leur volume augmente. Dans une solution très hypotonique (100 mOs), la membrane cellulaire du globule rouge peut se rompre : le globule rouge se vide de son hémoglobine, ne laissant plus que son enveloppe. Il est alors appelé fantôme de globule rouge (RBC ghost). Dans une solution hypertonique, l’eau sort des cellules, qui s’effondrent sur elles-mêmes et adoptent une forme avec des pointes (les globules rouges sont alors appelés échinocytes. D’après <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/cmb/cells/pmemb/osmosis.html>

5.1.2 Forme des fonctions d’autocorrélation

Des mesures de diffusion de FL-MA ont été effectuées à 25°C ; aucune corrélation n’est alors observée (figure 5.3a). Cela pourrait être dû à une diffusion trop lente à cette température non physiologique pour être mesurable avec notre montage de FCS.

À la température de 37°C, le corrélogramme n’est plus plat (figure 5.3b) et le temps de diffusion peut être mesuré.

Sur la figure 5.3 sont représentées les fonctions d’autocorrélation mesurées respectivement pour une protéine (FL-MA) et un analogue lipidique fluorescent (FL-G_{M1}). Les fonctions d’autocorrélation obtenues pour les analogues lipidiques fluorescents sont ajustées de façon satisfaisante par une ACF correspondant à la diffusion libre à 2 dimensions d’une espèce. La fonction d’autocorrélation obtenue pour FL-MA peut être ajustée par une ACF correspondant à la diffusion libre de deux espèces. Le choix de la fonction utilisée pour ajuster l’ACF obtenue expérimentalement a été réalisé comme expliqué dans la section 3.1.2.

5.1.3 Lois de diffusion FCS mesurées sur globules rouges non traités

Les lois de diffusion obtenues pour les analogues lipidiques fluorescents FL-G_{M1}, FL-SM et FL-PC sont identiques : ce sont des droites passant par l’origine, de même

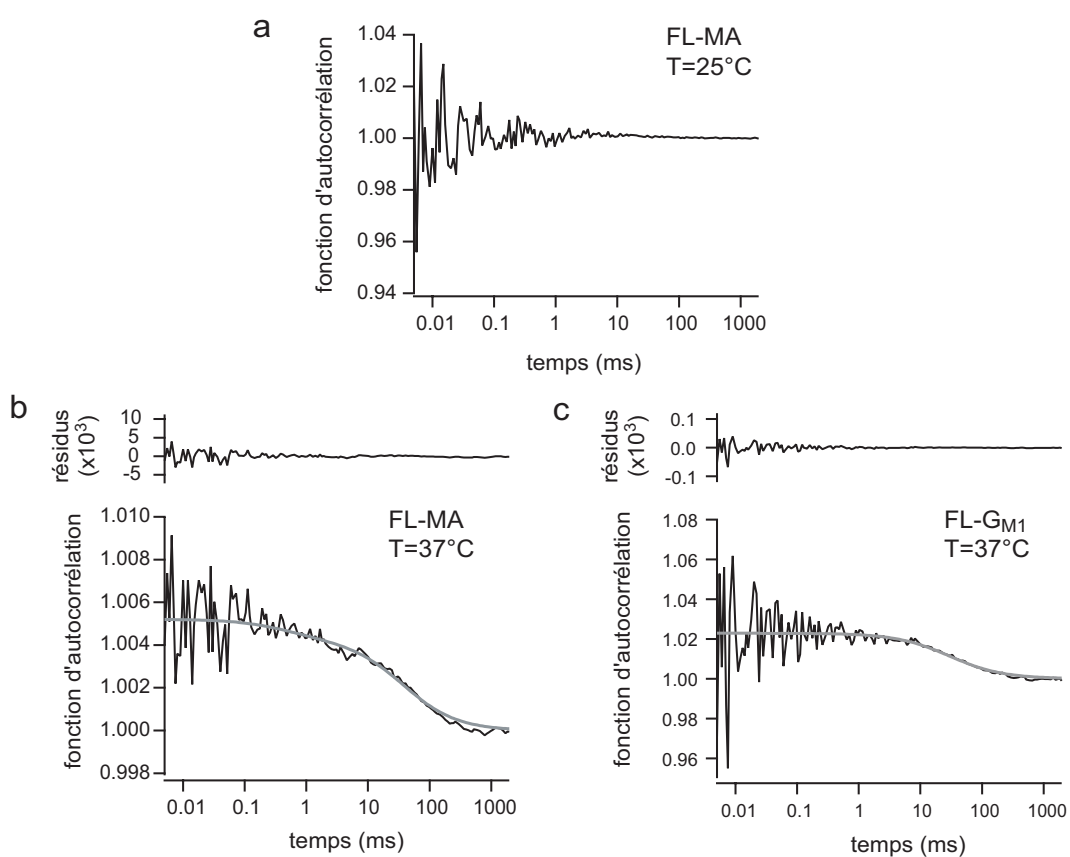


FIG. 5.3 – Fonction d'autocorrélation mesurée pour FL-MA dans les globules rouges à a) $T = 25^\circ\text{C}$ et b) $T = 37^\circ\text{C}$. c) Fonction d'autocorrélation mesurée pour FL- G_{M1} dans les globules rouges à $T = 37^\circ\text{C}$.

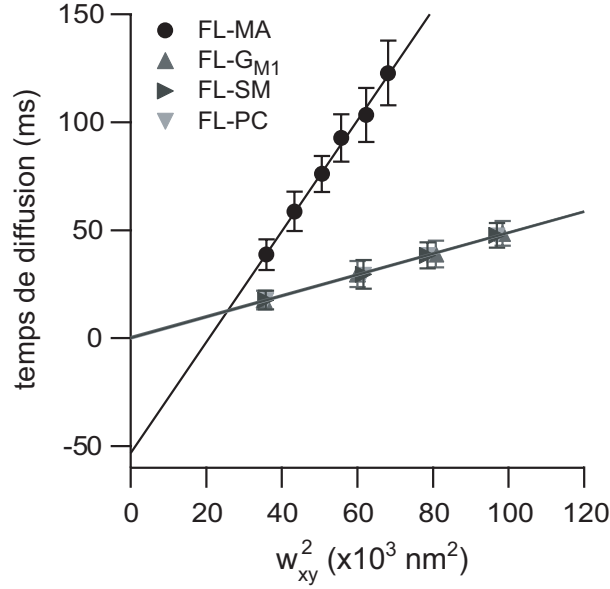


FIG. 5.4 – Lois de diffusion FCS mesurées dans les globules rouges, en l'absence de traitements. Sont étudiés ici FL-MA ainsi que les lipides FL-G_{M1}, FL-SM et FL-PC.

coefficient directeur (voir figure 5.4). Le coefficient de diffusion correspondant est : $D_{\text{eff}} \approx 0.52 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

Au contraire, la loi de diffusion mesurée pour FL-MA est une droite affine avec une ordonnée à l'origine négative. Cette forme de loi de diffusion FCS peut être expliquée par une diffusion dans un réseau. Ce réseau pourrait être dû au cytosquelette de spectrine du globule rouge. Afin de vérifier cette hypothèse, il est possible d'agir sur le cytosquelette par divers traitements.

5.1.4 Traitements du cytosquelette de spectrine

Deux types de protocoles sont utilisés pour modifier la structure du cytosquelette de spectrine ou la qualité de l'attachement de ce réseau avec la membrane érythrocytaire. Ils sont exposés dans le paragraphe B.5 de l'annexe.

Traitement par un antibiotique polyénique : l'amphotéricine B et la nystatine

Il est possible d'induire un détachement du cytosquelette de spectrine de la membrane en réduisant la force ionique de l'espace intracellulaire. L'amphotéricine B et la nystatine permettent d'augmenter la perméabilité cationique de la membrane cellulaire, et donc de réduire la force ionique intracellulaire après plusieurs lavages dans une solution de force ionique faible. Ces drogues tendent à donner une forme d'échinocytes aux globules rouges plongés dans un milieu de faible force ionique [Glaser 79].

Afin de réaliser une telle expérience, on rince d'abord les cellules dans une solution de force ionique élevée. On rince ensuite plusieurs fois les cellules dans une solution

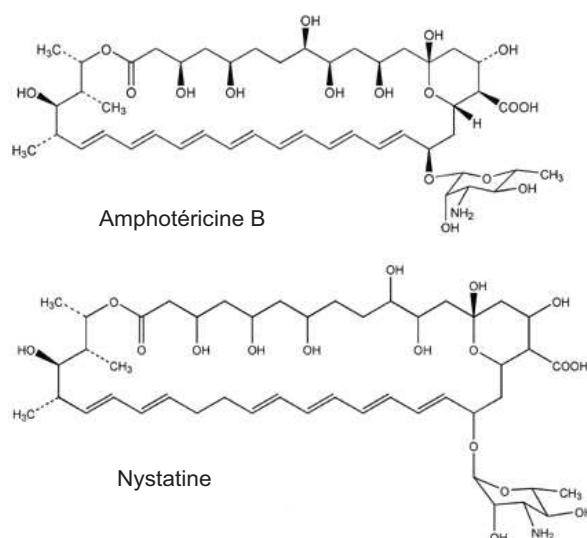


FIG. 5.5 – Structure de l'amphotéricine B et de la nystatine

de force ionique faible contenant un antibiotique polyénique (amphotéricine B ou nystatine) afin de réduire la concentration intracellulaire en cations des cellules. On rince ensuite les cellules avec une solution de force ionique faible, cette fois-ci sans antibiotique, afin de chasser celui-ci de la membrane.

Ces expériences doivent être analysées avec précaution : le mécanisme menant à la formation de pores et donc à l'augmentation de la perméabilité de la membrane passe par une étape d'association de l'antibiotique polyénique avec le cholestérol [Silva 06]. La formation d'un tel complexe déplace inévitablement les équilibres chimiques au sein de la membrane. Il peut donc exister des effets non négligeables autres que le seul détachement du cytosquelette de spectrine de la membrane.

Incubation à 49°C

Le détachement du réseau de spectrine de la membrane des globules rouges peut également être obtenu par incubation des globules rouges pendant 15 min à 49°C avant observation à 37°C.

Résultats pour FL-MA

Lorsque de tels traitements sont utilisés, la loi de diffusion FCS est modifiée. Elle est toujours assimilable à une droite tant que le waist w reste compris entre 180 nm et 400 nm, mais l'ordonnée à l'origine augmente tout en restant négative et la pente de la droite diminue. Cet effet se retrouve pour chacun des traitements. On peut également remarquer que cet effet augmente avec la dose de drogue utilisée, jusqu'à retrouver une loi de diffusion FCS semblable à une loi de diffusion libre : l'ordonnée à l'origine devient nulle pour une concentration de 50 μM d'amphotéricine B. Il serait

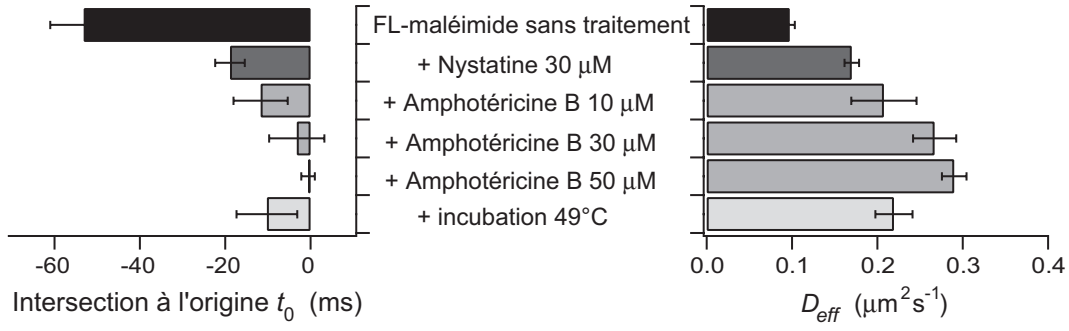


FIG. 5.6 – Lois de diffusion FCS mesurées pour FL-MA dans les globules rouges, après différents traitements du cytosquelette de spectrine.

donc possible que l'on ait relâché tout le confinement dû au cytosquelette par un tel traitement.

Résultats pour les lipides FL- G_{M1} , FL-SM et FL-PC

Les mêmes traitements ont été utilisés sur des membranes de globules rouges dans lesquelles ont été insérés respectivement les analogues lipidiques fluorescents FL- G_{M1} , FL-SM et FL-PC. On constate que les lois de diffusion FCS mesurées pour chacun de ces lipides ne sont modifiées par aucun de ces traitements. De par la forme des lois de diffusion obtenues pour les analogues lipidiques fluorescents et l'absence de modification de ces lois de diffusion par les divers traitements destinés à modifier le cytosquelette, il semblerait donc que la diffusion des lipides ne soit pas affectée par la présence du réseau de spectrine. Le coefficient de diffusion correspondant est $D_{\text{micro}} = 0,5 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

5.1.5 Absence de domaines isolés. Rôle du cytosquelette de spectrine.

Aucun confinement de type microdomaines isolés n'est mesuré dans les globules rouges

Nous avons déjà vu qu'aucun confinement de type microdomaine n'est mis en évidence par notre méthode dans les globules rouges. Les lois de diffusion mesurées pour FL- G_{M1} , FL-PC et FL-SM sont en effet des droites passant par l'origine.

FL-MA semble confiné transitoirement dans les mailles du réseau du cytosquelette de spectrine

Étudions maintenant la diffusion de FL-MA. D'abord, il est possible de supprimer totalement le confinement transitoire de FL-MA par le réseau en augmentant la concentration de l'antibiotique polyénique. L'effet de l'amphotéricine B augmente lorsque sa concentration diminue, jusqu'à être totalement supprimé pour une concentration de 50 μM .

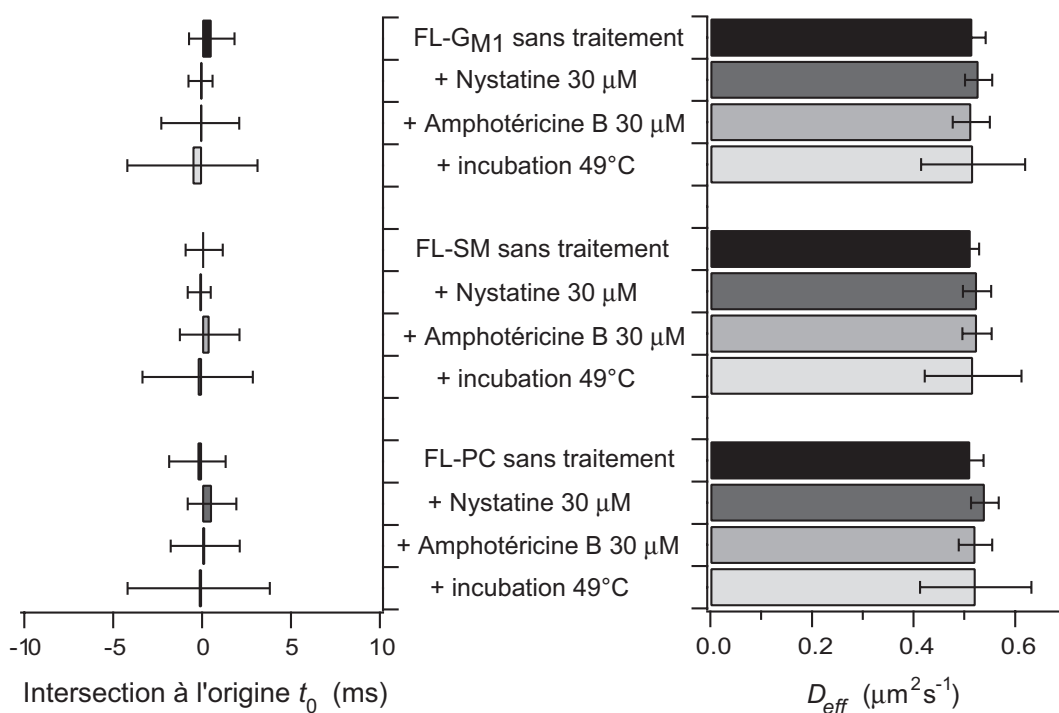


FIG. 5.7 – Lois de diffusion FCS mesurées pour les lipides FL-G_{M1}, FL-SM et FL-PC dans les globules rouges, après différents traitements du cytosquelette de spectrine.

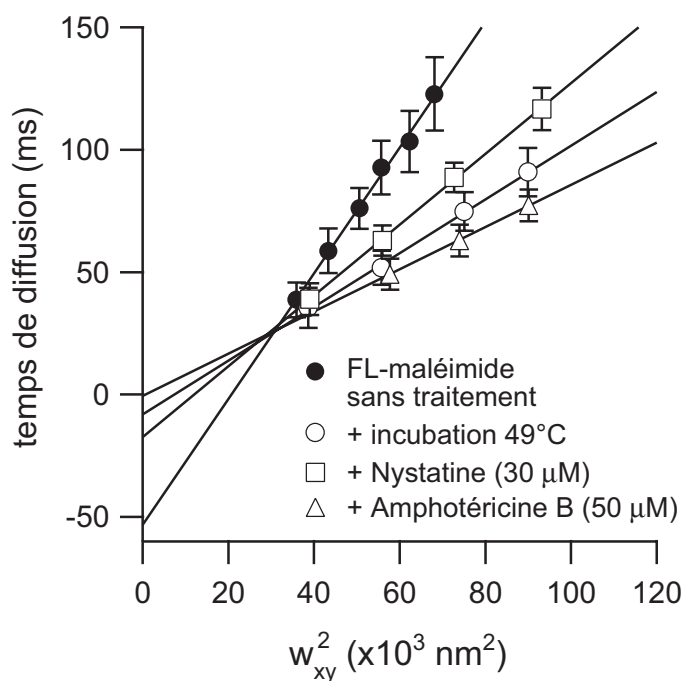


FIG. 5.8 – Lois de diffusion permettant d'évaluer la taille du réseau de spectrine des globules rouges.

La taille de la maille élémentaire du cytosquelette de spectrine peut être évaluée à partir de notre modèle de diffusion dans un réseau. Les droites correspondant à différentes forces de confinement (i.e. différentes hauteurs de barrière) se croisent en effet en un seul point, dont l'abscisse vaut $X_c^2 \approx 2$. L'aire moyenne des mailles du réseau de spectrine est donc d'environ $34\,000 \pm 10\,000 \text{ nm}^2$. En supposant que la forme moyenne des mailles est carrée, la longueur moyenne d'un côté de maille est de $185 \pm 30 \text{ nm}$; si on suppose que la forme moyenne est plutôt triangulaire (ce qui semble plus réaliste, les images de microscopie électronique ayant mis en évidence un réseau hexagonal), la longueur moyenne d'un côté de maille est de $280 \pm 50 \text{ nm}$.

De plus, il est possible, à partir de la position du point de croisement de toutes les droites correspondant à différentes forces de confinement, de calculer le coefficient de diffusion microscopique : $D_{\text{micro}} = 0,34 \text{ } \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

Ces résultats peuvent être comparés avec ceux obtenus par l'équipe de Kusumi, qui avait obtenu une surface moyenne pour une maille de réseau de l'ordre de $9\,300 \text{ nm}^2$ [Tomishige 98], ce qui correspond à un diamètre de maille de 110 nm si la forme de la maille est supposée circulaire. D'autre part, le coefficient de diffusion microscopique mesuré par cette équipe est : $D_{\text{micro}} = 0,53 \text{ } \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

Les temps de résidence dans la maille sont remarquablement compatibles : Kusumi propose un temps de résidence de l'ordre de 350 ms , alors que nous calculons un temps de résidence par la même méthode (le temps de résidence étant le rapport de l'aire d'une maille par quatre fois le coefficient de diffusion macroscopique) de $350 \pm 20 \text{ ms}$ [Tomishige 98].

5.1.6 Le photoblanchiment mesuré dans les globules rouges

Les temps de diffusion mesurés étant très grands, il est préférable de vérifier que le loi de diffusion obtenue n'est pas un artefact lié au photoblanchiment des fluorophores.

Les lois de diffusion sont mesurées pour trois différentes puissances d'excitation, mesurées à l'entrée du microscope, c'est-à-dire après le télescope variable. Les lois de diffusion sont modifiées par la variation de puissance. Elles ont donc été obtenues dans des conditions non favorables, c'est-à-dire en présence de photoblanchiment.

Il semblerait que les lois de diffusion obtenues pour différentes puissances d'excitation soient différentes. Néanmoins, les déviations observées avec une loi de diffusion normale (droite passant par l'origine) ne peuvent pas être expliquées par le photoblanchiment. Le photoblanchiment diminue davantage le temps de diffusion aux temps longs qu'aux temps courts et donc aux grands waists; il ne peut donc expliquer une ordonnée à l'origine négative.

5.2 Cellules eucaryotes à l'état d'équilibre : travail sur les cellules COS-7

La forme de la fonction d'autocorrélation GM1-Bodipy a déjà été étudiée dans le chapitre 3, de même que le tracé de sa loi de diffusion. Nous allons étendre cette étude à d'autres lipides membranaires ainsi qu'à des protéines, soit transmembranaires, soit liées à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (figures 5.9 et 5.10).

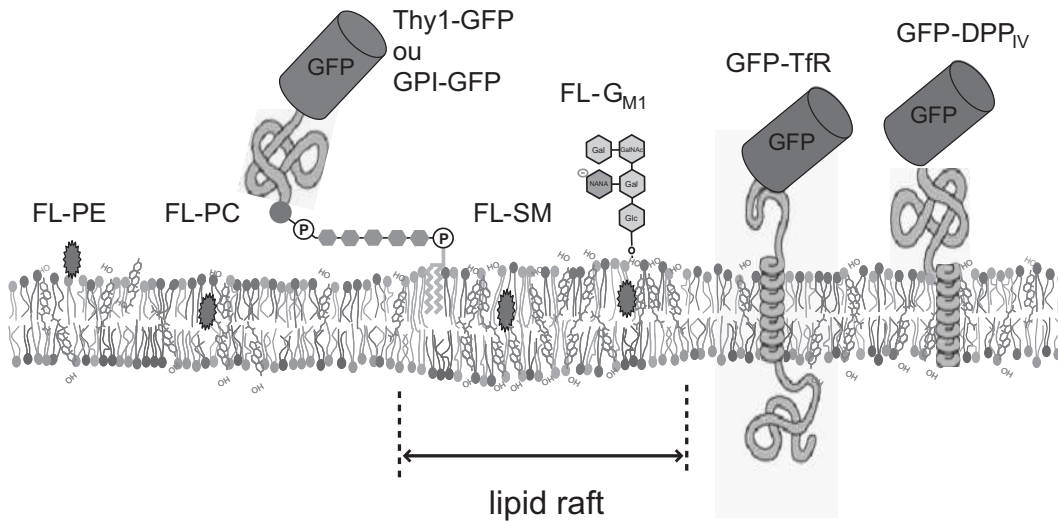


FIG. 5.9 – Molécules étudiées par analyse FCS.

Quatre analogues lipidiques fluorescents : Bodipy-phosphatidylcholine (FL-PC), Bodipy-phosphatidyléthanolamine (FL-PE), Bodipy-sphingomyéline (SM) et FL-G_{M1}. Deux protéines transmembranaires : le récepteur de la transferrine (GFP-TfR) et le récepteur de l'adénosine déaminase (DPP_{IV}). Deux protéines ancrées GPI : GFP-GPI et GFP-Thy1.

5.2.1 Lois de diffusion FCS mesurées dans les cellules eucaryotes COS-7 : article paru dans EMBO Journal

L'article ci-après résume les résultats expérimentaux obtenus dans les cellules COS-7, pour les différentes molécules fluorescentes de la figure 5.9. Il apparaît d'abord que les lois de diffusion FCS obtenues peuvent varier de façon importante pour les différents groupes de molécules utilisées.

D'une part, les analogues fluorescents à divers sphingolipides et les protéines ancrées GPI sont sensibles à une organisation en microdomaines isolés. D'autre part, un confinement de type réseau a pu être mis en évidence pour la protéine transmembranaire GFP-TfR.

L'utilisation de drogues modifiant la structure du cytosquelette et/ou des radeaux lipidiques a montré que ces domaines isolés étaient très susceptibles d'être des radeaux lipidiques tels qu'ils ont été définis dans cette thèse, tandis que le réseau

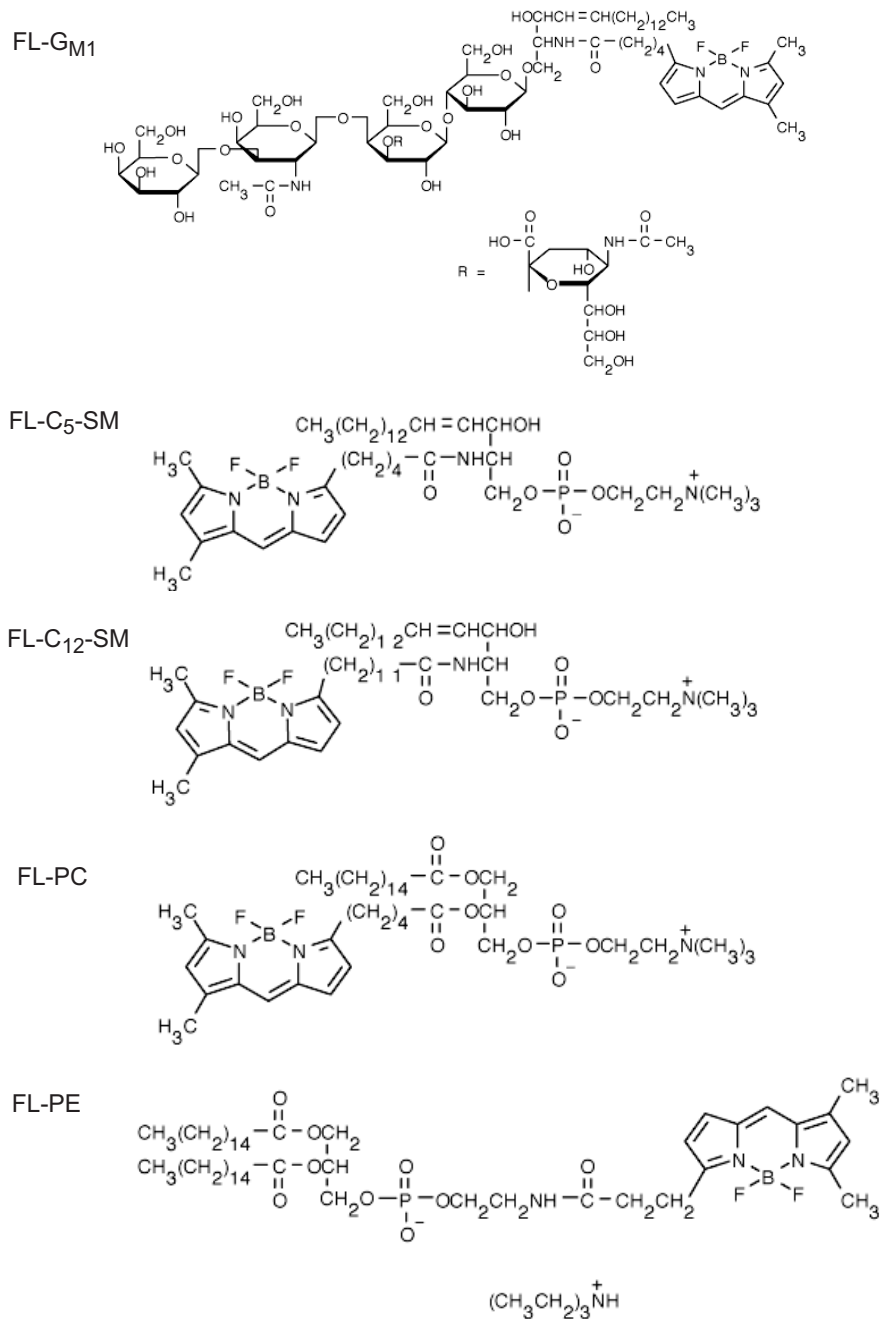


FIG. 5.10 – Structure des analogues fluorescents utilisés pour l'étude des globules rouges

était lié à la présence du cytosquelette.

Enfin, nous avons pu montrer que si les lipides et les protéines ancrées GPI n'étaient pas sensibles à la présence du cytosquelette, la protéine transmembranaire GFP-TfR subit à la fois un confinement transitoire dans les mailles du réseau de cytosquelette et dans les microdomaines isolés assimilés aux radeaux lipidiques. Le modèle de ce double confinement est présenté sur la figure 5.11.

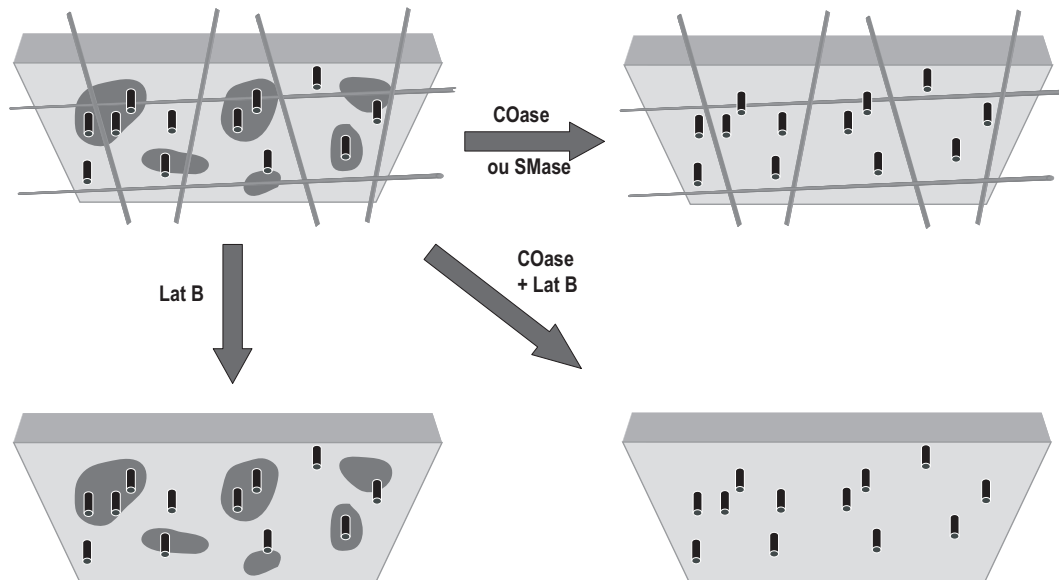


FIG. 5.11 – Modèle du double confinement par les radeaux lipidiques et le cytosquelette subi par les protéines transmembranaires ayant une partie intracytoplasmique. Après désorganisation du cytosquelette par addition de Latrunculine, les protéines ne subissent plus que le confinement transitoire dans les radeaux lipidiques. Après désorganisation des radeaux lipidiques par addition de cholestérol oxydase ou sphingomyélinase, les protéines ne subissent plus que le confinement transitoire par le cytosquelette. Le double traitement permet une diffusion libre dans la membrane cellulaire. Figure fournie par F. Conchonaud

Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork

Pierre-François Lenne^{1,2,7}, Laure Wawrezniecek^{1,2,3,4,5,7}, Fabien Conchonaud^{3,4,5}, Olivier Wurtz^{3,4,5,8}, Annie Boned^{3,4,5}, Xiao-Jun Guo^{3,4,5,6}, Hervé Rigneault^{1,2}, Hai-Tao He^{3,4,5} and Didier Marguet^{3,4,5,*}

¹Institut Fresnel, Université Paul Cézanne, Marseille, France, ²CNRS UMR 6133, Marseille, France, ³Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée, Marseille, France, ⁴INSERM, UMR 631, Marseille, France, ⁵CNRS, UMR 6102, Marseille, France and ⁶Laboratoire de Biochimie et Physicochimie des Membranes Biologiques, Université Paul Cézanne, Marseille, France

It is by now widely recognized that cell membranes show complex patterns of lateral organization. Two mechanisms involving either a lipid-dependent (microdomain model) or cytoskeleton-based (meshwork model) process are thought to be responsible for these plasma membrane organizations. In the present study, fluorescence correlation spectroscopy measurements on various spatial scales were performed in order to directly identify and characterize these two processes in live cells with a high temporal resolution, without any loss of spatial information. Putative raft markers were found to be dynamically compartmented within tens of milliseconds into small microdomains ($\varnothing < 120$ nm) that are sensitive to the cholesterol and sphingomyelin levels, whereas actin-based cytoskeleton barriers are responsible for the confinement of the transferrin receptor protein. A free-like diffusion was observed when both the lipid-dependent and cytoskeleton-based organizations were disrupted, which suggests that these are two main compartmentalizing forces at work in the plasma membrane.

The EMBO Journal advance online publication, 6 July 2006; doi:10.1038/sj.emboj.7601214

Subject Categories: membranes & transport

Keywords: actin meshwork; confined diffusion; fluorescence correlation spectroscopy; lipid rafts; membrane microdomain

Introduction

Although it is generally assumed that lateral heterogeneities exist in cell membranes (Edidin, 2003; Simons and Vaz, 2004), the factors responsible for the local organization of

the plasma membrane are poorly understood. Various mechanisms have been suggested to explain the significant discrepancies observed in the diffusion rates of lipids and proteins between artificial membranes and plasma membranes. For instance, membrane protein diffusion differs from pure Brownian diffusion because of the transient interactions occurring with large multimeric complexes (Marguet *et al*, 1999), the obstacles resulting from direct and indirect molecular immobilization (Sako and Kusumi, 1994; Fujiwara *et al*, 2002), and the corrals formed on various submicrometric scales (Yechiel and Edidin, 1987). There is still some controversy about the ability of lipids to form domains, which are also known as lipid rafts, in plasma membranes (Simons and Ikonen, 1997; Brown and London, 1998; Edidin, 2003; Munro, 2003; Simons and Vaz, 2004; van Meer, 2005; Marguet *et al*, 2006). In these lipid domains, cholesterol is thought to be tightly packed with long saturated fatty acid chains of specific glycosphingolipids, thus favoring lipid phase separation processes. It has been suggested that these domains may be insoluble in nonionic detergents (Brown and London, 1998; Drevot *et al*, 2002). In addition to studies characterizing biochemical rafts, morphological approaches have been used to prove the existence of these rafts in cell membranes, but the conclusions drawn have been rather controversial, since the results depended strongly on the methods used. When the lateral motion of lipid probes was analyzed using single dye tracing methods, the domain size was found to range from 0.2 to 2 μ m (Schutz *et al*, 2000). These data are in the same range as those obtained on the barrier-free paths of membrane proteins, but the latter depend mainly on how the cytoskeleton is organized (Sako and Kusumi, 1994). Other studies using biophysical approaches on live cells have strongly supported the idea that rafts are small diffusive entities (Pralle *et al*, 2000; Sharma *et al*, 2004). Fluorescence resonance energy transfer methods (FRET) have been used to probe the molecular aggregates present in lipid rafts. Experiments of this kind using different lipid-modified proteins expressed in the apical membrane of MDCK cells have led to divergent conclusions (Kenworthy and Edidin, 1998; Zacharias *et al*, 2002; Hess *et al*, 2005). FRAP measurements on live cells have provided evidence that the anchoring mode determines the protein-raft interaction dynamics (Shvartsman *et al*, 2003). A direct visualization of liquid-ordered domains was recently obtained using fluorescent cell staining procedures, although information is still lacking about the dynamic aspects of these structures (Gaus *et al*, 2003). In fact, these methods span different spatiotemporal scales, and the data obtained about the features of rafts, and even their existence in live cells, may therefore not always seem to be in agreement.

Improving our knowledge of membrane organization requires developing new methods in which the temporal resolution is improved without any loss of spatial information. For instance, FRAP measurements performed on different

*Corresponding author. Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, CNRS, Parc Scientifique de Luminy, Case 906, 13288 Marseille Cedex 13009, France. Tel.: +33 491 269 128; Fax: +33 491 269 430; E-mail: marguet@ciml.univ-mrs.fr

⁷These authors contributed equally to this work

⁸Present address: Université de Rouen, INSERM U413, Mont Saint Aignan, France

Received: 9 February 2006; accepted: 6 June 2006

spatial scales have made it possible to identify micrometer-scale domains present in the plasma membrane of fibroblasts (Yechiel and Edidin, 1987). By applying a similar strategy using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) methods, we recently managed to distinguish between different submicron confinement models. In the latter study, we described a novel method of performing FCS on various observation scales (Wawrezynieck *et al*, 2004) and developed a simple analytical method of investigating the complexity of the cell membrane organization and the dynamic processes involved (Wawrezynieck *et al*, 2005). This novel method could be used to identify and discriminate between variously organized submicroscopic domains preventing the free lateral diffusion of membrane components (Saxton, 2005). The *FCS Diffusion Law* was defined in the latter study as the plot of the diffusion time (i.e. the average time a fluorescent molecule stays within the illuminated area) versus the observation area. Based on extensive confined diffusion modeling studies, it was established that the y -intercept t_0 in the graph of the FCS diffusion laws is positive in the case of confining in microdomains (dynamic partitioning into microdomains) but negative in that of trapping in a meshwork (actin-based cytoskeleton corrals).

Here, it was proposed to investigate the dynamics of membrane organization in live cells. The diffusion behavior of various membrane components was described and it was established whether molecular confinement depends on the specific cholesterol/sphingomyelin membrane content or on the presence of actin-based cytoskeleton barriers.

Results

Molecules used to establish the presence of domains in plasma membranes

To establish the presence of domains in the plasma membrane, the diffusion behavior of four different groups of membrane components was investigated: (1) a glycerophospholipid group with two fluorescent lipid analogs, BODIPY- C_5 -phosphatidylcholine (FL-PC) and BODIPY-dihexadecanoyl-phospho-ethanolamine (FL-PE), (2) a sphingolipid group including the BODIPY- C_5 -sphingomyelin (FL-SM) and BODIPY- C_5 -ganglioside- G_{M1} (FL- G_{M1}) analogs, (3) a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein group in which the GFP was either tagged onto the GPI-anchoring signal originating from the decay accelerating factor (GFP-GPI) or inserted just after the signal peptide of Thy1 (GFP-Thy1), and (4) a GFP-tagged transmembrane protein group including the dipeptidyl peptidase IV (DPP_{IV}-GFP) and the transferrin receptor (TfR-GFP) (Figure 1A).

To examine the mobility of lipid analogs, COS-7 cells were labeled using the lipid exchange method (Martin and Pagano, 1994). Laser scanning confocal microscopy showed that the probes were uniformly distributed in the plasma membrane. A vesicular staining pattern consisting of small intracellular dots was also observed (Figure 2A–C). All the GFP-tagged proteins were efficiently addressed to the plasma membrane when transiently expressed in COS-7 cells (Figure 1B and data not shown). Vesicular staining was also detected in the cytosol, especially in the perinuclear area.

Based on previous studies, these molecules are known to be either present in high levels or depleted from detergent resistant membranes (DRMs). This was confirmed by Brij 98

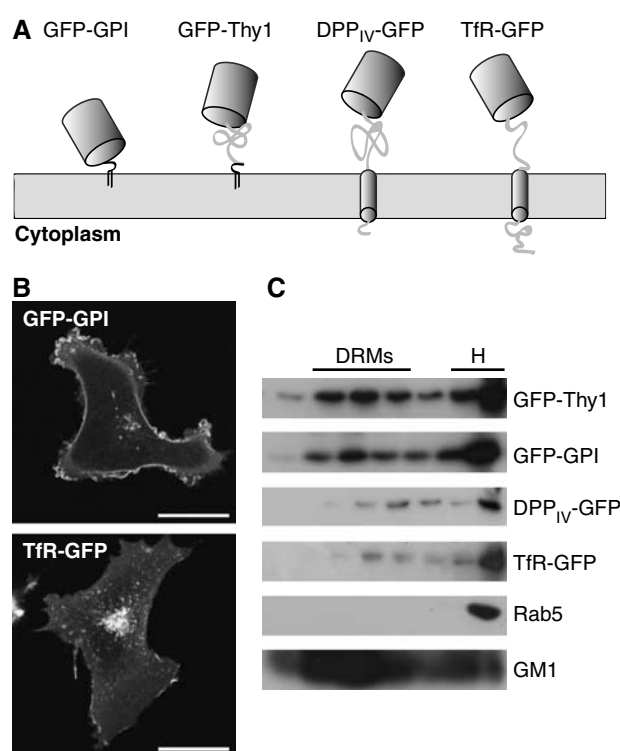


Figure 1 GFP-tagged proteins used in this study. (A) Membrane topology of the GFP-tagged proteins. (B) Confocal images of COS-7 cells expressing the GFP-GPI and TfR-GFP proteins. Scale bar is 20 μ m. (C) Brij 98 solubilized PNS from transfected COS-7 cells was fractionated on the sucrose gradient and blotted with anti-GFP, anti-Rab 5 antibodies or cholera toxin B.

detergent-insolubility experiments performed at physiological temperatures (Drevot *et al*, 2002). Although the BODIPY fluorophore can affect the properties of lipids, yielding analogs with quite different characteristics from those of their natural counterparts (Kuerschner *et al*, 2005), both FL- G_{M1} and FL-SM were readily detected in DRMs, where they accounted for 11 and 17% of the total fluorescence, respectively. This association is not negligible, since under the same experimental conditions, about 20% of the GFP-Thy1 or GFP-GPI molecules were detected in DRMs, whereas those anchored by a classical transmembrane peptide were barely detectable (Figure 1C).

The different groups of membrane components follow distinct FCS diffusion laws

As described previously, the *FCS diffusion law* giving the diffusion time τ_d (i.e. the average time a fluorescent molecule stays within the illuminated area) versus the beam area, where w denotes the beam radius, should provide a suitable analytical method for determining the diffusion behavior of a molecule in the membrane (Saxton, 2005; Wawrezynieck *et al*, 2005). This approach is based on the fact that if molecules diffuse freely, one can expect to obtain a linear function between τ_d and w^2 : the curve $\tau_d = f(w^2)$ will intercept the time origin and its slope will correspond to the diffusion coefficient D in this environment. In most situations where diffusion is hindered, the FCS diffusion law will no longer fit this scheme. By sizing the laser beam filling the microscope objective, we varied w experimentally from 200

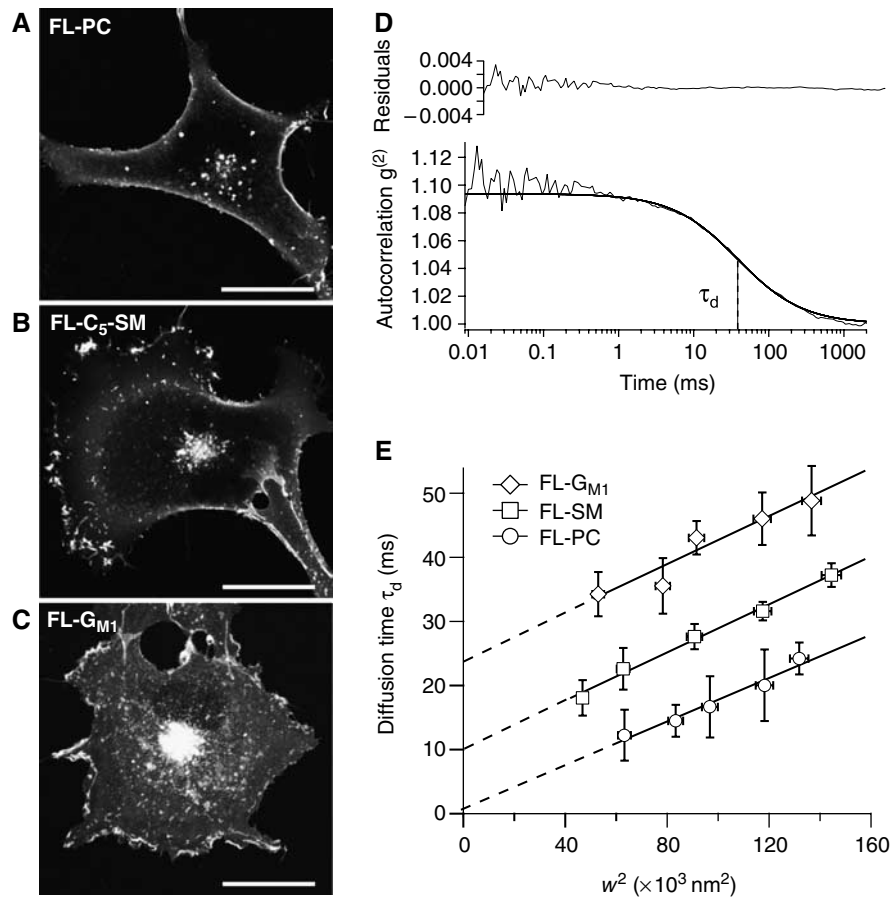


Figure 2 Diffusion behavior of lipid analogs. Confocal images of COS-7 cells after labeling with lipid analogs: (A) FL-PC, (B) FL-SM and (C) FL-GM₁. Scale bar is 20 μ m. (D) ACF obtained with FL-GM₁ lipids. The curve was satisfactorily fitted with a 1-species free diffusion model (see Supplementary data). The diffusion time τ_d was given by the lag time at half maximum. (E) Diffusion behavior of lipid analogs. Confinement times were determined from the position at which the diffusion curves and the time-axis intersected. Error bars in x and y give standard deviations (s.d.) of the means.

to 400 nm; the lower limit was imposed by the diffraction law, whereas the upper one was based on a compromise between the spatial resolution and FCS constraints.

We first investigated the lipid dynamics using trace mole fractions of probes relative to the total lipids in order to minimize any membrane perturbations. Based on experimental autocorrelation functions (ACF), the data were efficiently fitted using a single component, giving a single decay time (see Supplementary data and Figure 2D). In this case, τ_d was obtained by measuring the lag time at half the maximum ACF value. With all the lipid probes used, τ_d increased linearly with w^2 but the intersections with the time axis differed (Figure 2E). In the case of the glycerophospholipid analogs FL-PC and FL-PE, the FCS diffusion laws intercepted the time axis at the origin at almost null t_0 values (-0.4 ± 0.8 and 0.2 ± 0.7 ms, respectively). By contrast, t_0 was strictly positive in the case of the sphingolipid analogs FL-GM₁, FL-C₅-SM and FL-C₁₂-SM, where values of 24.3 ± 1.9 , 10.2 ± 0.6 and 9.7 ± 0.5 ms were obtained, respectively.

With all the chimeric proteins used, two decay times were clearly identified from the ACFs (Figure 3A–B and data not shown): a short time τ_{fast} and a longer one τ_d . We checked that the slow decay time corresponded to the diffusion time of plasma membrane-bound molecules, whereas the fast one corresponded to that of the intracellular pool. When detected

from outside by an Alexa488-conjugated anti-Thy1 Fab fragment, the lateral mobility of Thy1 showed a similar single long relaxation time to the longest one observed in the case of GFP-Thy1 (with a spot radius of ~ 240 nm, these times were 31.8 ± 5.8 and 27.4 ± 2.9 ms, respectively).

The FCS diffusion laws were then analyzed (Figure 3C). In the case of the two GPI-anchored proteins, GFP-Thy1 and GFP-GPI, t_0 was found to be significantly positive (18.4 ± 1.7 and 12.1 ± 2.5 ms, respectively), whereas the reverse was observed with the TfR-GFP, which gave a t_0 value of -20.4 ± 1.9 ms. Interestingly, the DPP_{IV}-GFP diffusion behavior was in between that observed with the GPI-anchored proteins and the TfR-GFP. The reason for this small positive intercept (4.8 ± 1.7 ms) will be discussed below.

In order to check whether the diffusion behavior reflected in the FCS corresponded to a significant fraction of the molecules tested, confocal FRAP measurements (Kenworthy *et al*, 2004) were performed. The mobile fraction M_f was assessed in terms of the percentage of the fluorescent molecules recovered in the bleached area during the FRAP experiment. All the lipid analogs were nearly 100% mobile, and $M_f > 95\%$ with FL-PC, FL-SM and FL-GM₁. In the case of the GFP-tagged proteins, the M_f value ranged between 77 and 92% (77, 85, 90 and 92% with TfR-GFP, DPP_{IV}-GFP, GFP-GPI and GFP-Thy1, respectively). The FCS diffusion laws given

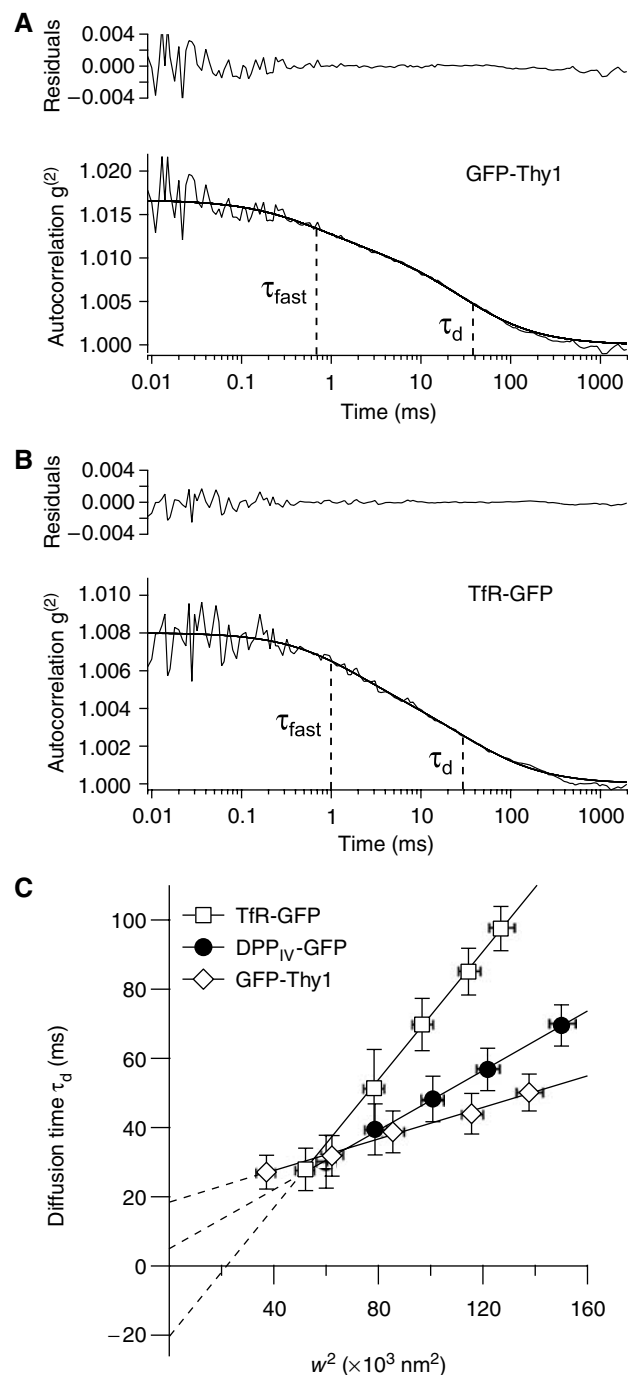


Figure 3 Diffusion behavior of GFP-tagged proteins. ACFs obtained with GFP-Thy1 (A) and TfR-GFP (B). In both cases, two decay times were clearly identified with the various probes used: a short time τ_{fast} and a longer one τ_d . (C) FCS diffusion laws in the case of TfR-GFP, DPPIV-GFP and GFP-Thy1. Error bars on the x and y axes give the s.d.s of the means.

above therefore accurately describe the behavior of a very large fraction of the lipid analogs and GFP-tagged proteins.

A broad range of t_0 values was obtained with the various molecules used to explore the occurrence of domains in the plasma membrane. Based on this parameter, three subsets of molecules were identified: the glycerophospholipid analogs (null t_0), the sphingolipid and GPI-anchored protein groups (positive t_0) and the transmembrane TfR-GFP (negative t_0).

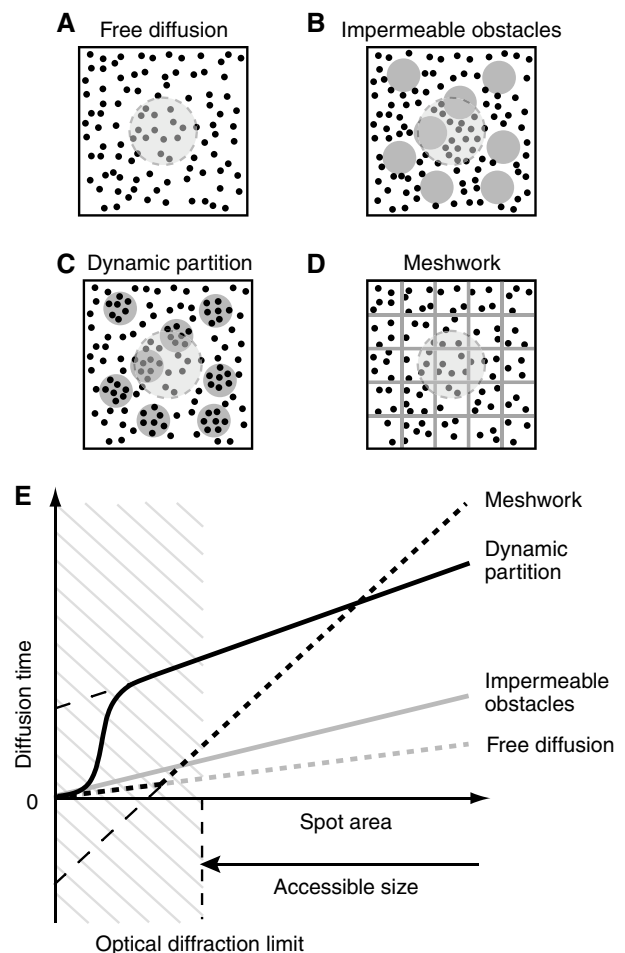


Figure 4 Simulated FCS diffusion laws corresponding to different membrane models. (A–D) Diffusion models for membrane organization. (A) In the free diffusion model, fluorescent molecules (black dots) show pure Brownian motion and fluorescence under the laser excitation spot (large gray circle). (B) In the presence of impermeable obstacles (gray spots), the diffusion is restricted to the free space. (C) When the domains are permeable (as the result of dynamic partition processes), the molecules can diffuse into and out of the microdomains and be transiently trapped (gray spots). (D) In a meshwork model, multiple adjacent domains are separated by barriers (gray lines) preventing the diffusion of the molecules. (E) Characteristic diffusion laws obtained for the different models. The diffusion time τ_d was analyzed as a function of the squared radius w^2 . Diffusion laws applying to the free diffusion model (dotted gray curve), the diffusion process in the presence of impermeable obstacles (gray curve), the dynamic partition model (dotted black curve) and the meshwork model (black curve). Diffusion laws cannot be determined experimentally below the diffraction limit. For detailed analyses, see the Supplementary data and Wawrezinieck *et al* (2004, 2005).

In view of the above data and the results of our previous numerical simulations (Wawrezinieck *et al*, 2005), where the change in the sign of the y-intercept t_0 was correlated with different modes of membrane compartmentalization, we hypothesized that simple confinement models would explain the deviations from free diffusion (Figure 4; see also the Supplementary data). A positive t_0 was linked, for example, to the dynamic partition model, which may provide a basis for explaining the diffusion behavior of the sphingolipid and GPI-anchored protein groups, whereas with a negative t_0 , TfR molecules may be subjected to membrane confinement due

to meshwork effects. Lastly, because of the null t_0 , the glycerophospholipid analogs may neither be confined within discrete domains nor be hindered by a meshwork.

A lipid-dependent microdomain organization confines sphingolipid analogs and GPI-anchored proteins within the plasma membrane of resting cells

Among the mechanisms possibly responsible for confinement in discrete microdomains, several lines of evidence combine to support the idea that cholesterol and sphingomyelin are involved in the control and the organization of local heterogeneities: the differential packing characteristics of glycerophospholipids and sphingolipids with cholesterol promote the formation of a liquid-ordered phase or a similar state, which coexists in the membrane plane with a liquid-disordered phase (Brown and London, 1998; Rietveld and Simons, 1998). To test whether this hypothesis holds in the case of

sphingolipid analogs and GPI-anchored proteins, cells were incubated in the presence of exogenous cholesterol oxidase (COase) or sphingomyelinase (SMase) to decrease the cholesterol and sphingomyelin membrane contents, respectively.

With 1 U/ml of COase, $23.3 \pm 2.2\%$ of the total cell cholesterol was converted into cholestenone. The ability of GPI-anchored proteins and sphingolipid analogs to float to the buoyant fractions of a sucrose gradient was subsequently found to be severely impaired (Figure 5A), and the FL-SM and FL-G_{M1} present in DRMs, as measured by spectrofluorimetry, decreased by 58 and 63%, respectively. This decrease in the cholesterol levels also induced significant changes in the behavior of GFP-GPI, since the curve of the corresponding FCS diffusion law then intercepted the time origin (0.2 ± 0.8 ms) (Figure 5B). Similar results were obtained with GFP-Thy1 and the sphingolipid analogs (Figures 5C, D

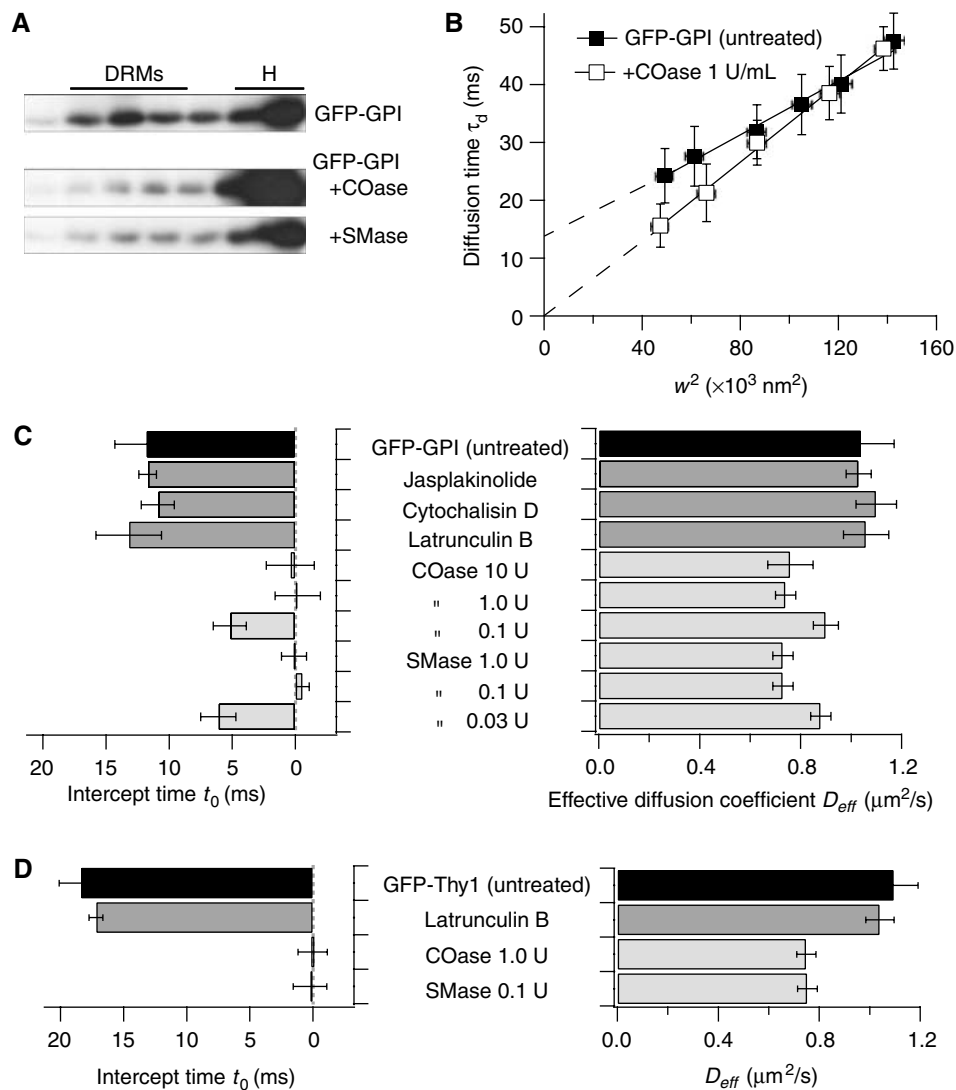


Figure 5 The confinement of GFP-tagged GPI-anchored proteins in microdomains is lipid-dependent. (A) Biochemical determination of GFP-GPI localization in DRMs after COase or SMase treatment. (B) FCS diffusion laws governing GFP-GPI proteins after cell treatment with COase. Error bars on the x and y axes are the s.d.s of the means. (C) Time intercept t_0 and effective diffusion coefficient D_{eff} obtained with GFP-GPI in untreated COS-7 cells (black bars), after cytoskeleton drug treatments (dark gray bars) or lipid modifications (light gray bars). (D) Idem in the case of GFP-Thy1 protein.

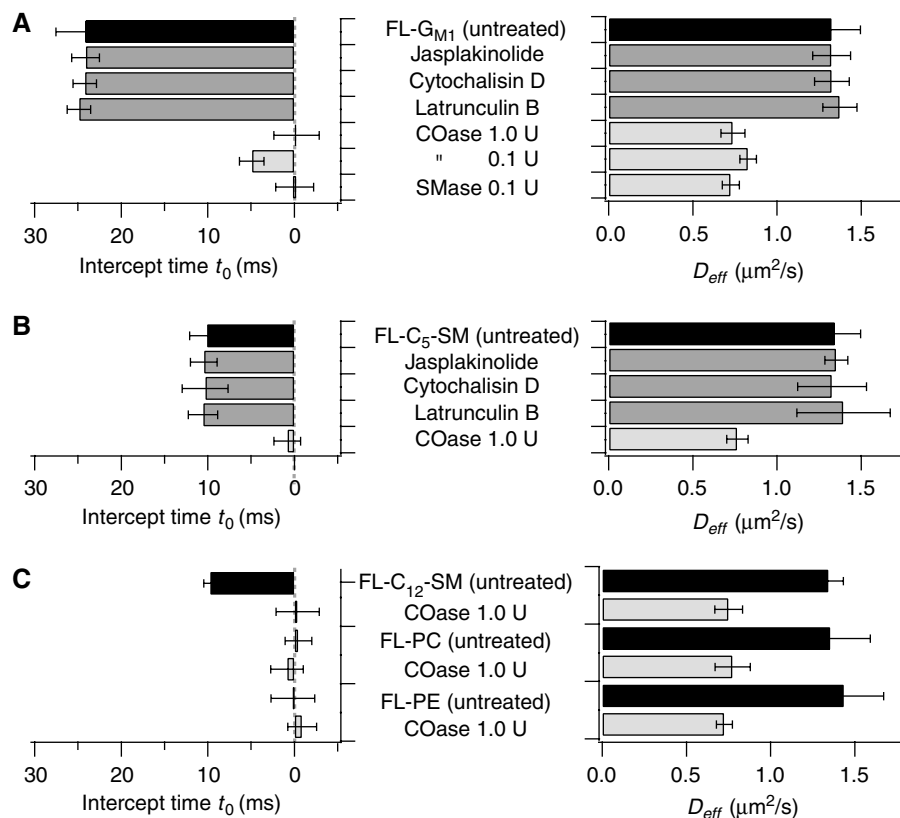


Figure 6 The confinement of lipid probes in the plasma membrane of COS-7 cells is lipid-dependent. Time intercept t_0 and effective diffusion coefficient D_{eff} obtained with FL- G_{M1} (A), FL- C_5 -SM (B) and the other lipid analogs used in this study (C) in untreated COS-7 cells (black bars), after applying cytoskeleton drug treatment (dark gray bars) or lipid modifications (light gray bars). Error bars give the s.d.s of the means.

and 6, respectively). Importantly, a 10-fold lower enzyme concentration, which converted $<10\%$ of the total cholesterol into cholestenone ($8.2 \pm 4.4\%$), led to an intermediate value between those obtained with cells treated and not with 1 U/ml of COase, as illustrated here in the case of GFP-GPI and FL- G_{M1} , (Figures 5C and 6A, respectively). The effects of the larger changes in the cholesterol content ($56.9 \pm 4.7\%$) induced by 10 U/ml of COase did not differ from those observed with 1 U/ml. All in all, these results suggest that the microdomain organization generated by dynamic partitioning processes no longer existed in these cell membranes.

We then hydrolyzed SM into ceramide by adding exogenous SMase to COS-7 cells. With 0.1 U/ml of SMase, $68 \pm 4\%$ of the total SM was hydrolyzed. At the same time, we noted that the presence of GFP-GPI within DRMs was also severely impaired after enzymatic treatment (Figure 5A). More importantly, the curves of all the FCS diffusion laws governing GFP-GPI, GFP-Thy1 and FL- G_{M1} intercepted the time origin (Figures 5C–D and 6A). Once again, we observed that the SM membrane concentration was critical, since titration experiments showed that the confinement of GFP-GPI disappeared in a dose-dependent manner (Figure 5C). Lower concentrations (0.03 U/ml) converting $54 \pm 4\%$ of the total SM led to an intermediate value between those obtained with cells treated or not with 0.1 U/ml of SMase, as illustrated in the case of GFP-GPI and FL- G_{M1} . The effects of higher SMase concentrations (1 U/ml) did not differ from those observed with 0.1 U/ml.

It was remarkable that the lipid-mediated microdomain organization was entirely abolished when only $\sim 20\%$ of the total cholesterol was converted into cholestenone by COase. This could be due to a combined effect of cholesterol hydrolysis and cholestenone production, since an antagonizing action of the cholestenone to ordered domains has been reported (Xu and London, 2000). A similar scenario might occur upon SMase treatment as well. Ceramide has recently been shown to displace cholesterol from sphingomyelin-cholesterol domains as well as to induce strong alterations of the lateral organization in model membranes (Megha and London, 2004).

After COase or SMase treatment, a similar decrease in D_{eff} occurred in both the GPI-anchored proteins and sphingolipid analogs ($\sim 0.75 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (Figures 5 and 6). The fact that this was also the case with the glycerophospholipid analogs although the t_0 value was still null (Figure 6C) suggested that an overall change in the plasma membrane viscosity had also occurred due to the enzymatic change in the lipid membrane composition. All in all, these results strongly support the idea that in the absence of molecular crosslinking processes, sphingolipid analogs and GPI-anchored proteins are confined by a cholesterol and sphingomyelin-dependent process of microdomain formation.

A cytoskeleton-mediated meshwork hinders the lateral mobility of TfR-GFP

The TfR-GFP diffusion law curve, which showed a negative t_0 , suggested that TfR molecules diffused in a meshwork

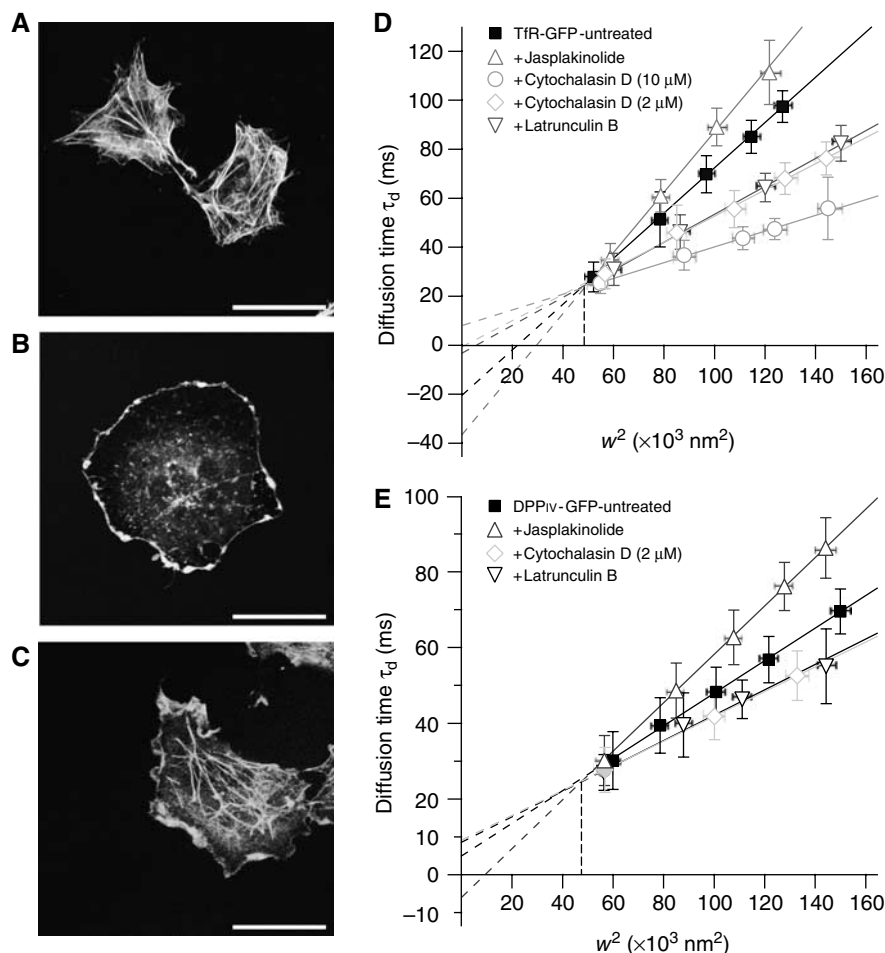


Figure 7 The GFP-tagged transmembrane protein diffusion laws are actin-dependent. Confocal images of rhodamine phalloidin labeling of F-actin in COS-7: (A) untreated; (B) 1 μM latrunculin B; (C) 0.4 μM jasplakinolide. Diffusion laws governing TfR-GFP (D) and DPP_{IV}-GFP (E) after applying cytoskeleton drug treatment. Error bars on the x and y axes are the s.d.s of the means.

context (Figure 4D and E). To investigate the possible involvement of the cytoskeleton, COS-7 cells were treated with drugs known to alter the actin-based cytoskeleton, such as latrunculin-B (an actin polymerization inhibitor), cytochalasin D (an actin depolymerization inducer) or jasplakinolide (an actin filament stabilizer). Suitable experimental conditions were first setup to ensure that these drugs changed the pattern of cytoskeleton organization without significantly affecting the cell morphology (Figure 7A–C).

The lateral mobility of TfR-GFP was then assessed (Figure 7D). Under latrunculin B (1 μM) or cytochalasin D (2 μM) treatment, the FCS diffusion law curve intercepted the y-axis near the time origin (-3.2 ± 1.8 and 0.7 ± 1.8 ms, respectively). These findings indicate that the physical barriers confining TfR-GFP were lowered. At the same time, the D_{eff} value increased from 0.27 ± 0.01 to 0.44 ± 0.02 μm 2 /s, which suggests that the long-range diffusion was less strongly impeded by the barriers between adjacent domains. Conversely, treatment with jasplakinolide (0.4 μM) decreased both the D_{eff} and t_0 values to 0.20 ± 0.01 μm 2 /s and -36.5 ± 5.4 ms, respectively. This decrease suggests that the barriers confining TfR-GFP were reinforced by jasplakinolide treatment.

By contrast, it is noteworthy that neither the actin-based skeleton alterations induced by latrunculin B nor its stabilization by jasplakinolide had any effect on the molecular confinement observed with the GPI-anchored proteins and the sphingolipid analogs (Figures 5 and 6). Neither the t_0 nor D_{eff} values were affected under the experimental conditions that drastically altered the diffusion of TfR-GFP.

Meshwork and discrete domains contribute concomitantly to the dynamic compartmentalization of transmembrane proteins in the cell membrane

The shape of the diffusion law curve obtained for DPP_{IV}-GFP suggested that confinement by discrete domains may have occurred since, as observed in the case of GPI-anchored proteins, t_0 was positive. However, a similar study to that carried out on TfR-GFP showed that the FCS diffusion law was actin-dependent (Figure 7E). Treatment with latrunculin B or cytochalasin D led to increases in both t_0 and D_{eff} , whereas jasplakinolide treatment decreased both t_0 and D_{eff} , and even led to a negative t_0 value. More intriguingly, although TfR-GFP and DPP_{IV}-GFP were obviously sensitive to cytoskeleton-based compartmentalization, the possibility that discrete domain confinement may have occurred was

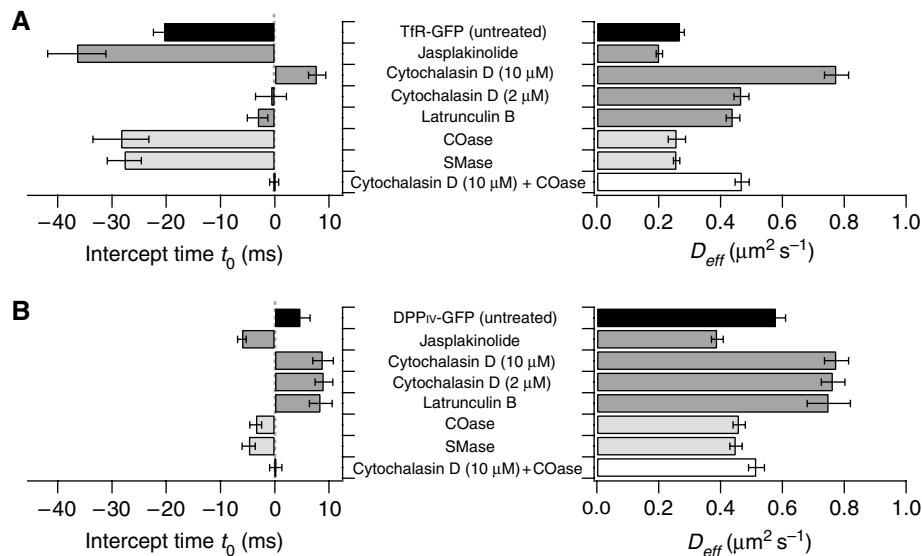


Figure 8 Both actin meshwork and lipid domains contribute to transmembrane protein compartmentalization. Time intercept t_0 and effective diffusion coefficient D_{eff} obtained with Tfr-GFP (A) and DPP_{IV}-GFP (B) in untreated COS-7 cells (black bars), after applying cytoskeleton drug treatment (dark gray bars), after lipid modifications (light gray bars) or combined treatment (open bars). COase and SMase concentrations were 1 and 0.1 U/ml, respectively. Error bars are the s.d.s of the means.

suggested by the fact that high drug concentrations (cytochalasin D 10 μM) disrupted the actin network organization and gave a t_0 of 7.8 ± 1.6 and 8.9 ± 1.9 ms, respectively. In addition, the lipid modifications induced by COase or SMase systematically decreased the respective t_0 values (Figure 8). These two findings suggest that both meshwork and isolated domains contributed simultaneously to the DPP_{IV}-GFP and Tfr-GFP diffusion process. To test this hypothesis, we then established the corresponding FCS diffusion laws under experimental conditions where actin-based cytoskeleton barriers and cholesterol were simultaneously modified (Figure 8). Significantly, τ_d for DPP_{IV}-GFP and Tfr-GFP was found to be linear in w^2 . Thus, when both confinement forces were relaxed, these proteins recovered free-like diffusion behavior.

Our study also indicated that the microdomain and the meshwork confinement may mask each other in the FCS law analysis. Indeed, we could interpret the differences in the diffusion modes between Tfr-GFP and DPP_{IV}-GFP in terms of the differential strength of the actin-based and lipid-dependent confinement processes. COase and SMase treatments both abolished the lipid-dependent confinement process but unraveled the cytoskeleton-dependent one, which was in turn abolished by cytochalasin D or latrunculin B (Figure 8). With these Tfr-GFP and DPP_{IV}-GFP proteins, COase treatment decreased the t_0 values to -28.4 ± 5.2 and -3.5 ± 1.1 ms, respectively. It was therefore deduced that the confinement of the cytoskeleton was about eight times stronger with Tfr-GFP than DPP_{IV}-GFP. On the opposite, upon impairing the actin network, it was observed that both proteins underwent an almost identical weak lipid-dependent microdomain confinement process (7.8 ± 1.6 and 8.9 ± 1.9 ms for Tfr-GFP and DPP_{IV}-GFP, respectively). It seems likely that the effects of cytoskeleton and lipid confinement may have been additive, but this hypothesis remains to be confirmed in further studies. The actin-based confinement process was stronger than the lipid-dependent one in the case of Tfr-GFP, whereas the reverse was true in that of DPP_{IV}-GFP.

Discussion

The present study describing the diffusion behavior of diverse membrane components provides insights on the role of lipids in compartmentalizing the cell membrane. First, based on FCS data obtained on various spatial scales, we established that the sphingolipid analogs and GPI-anchored proteins undergo transient confinements in isolated microdomains. Secondly, the molecular origin of these confinement processes was found to be cholesterol- and sphingomyelin-dependent. Thirdly, their compartmentalization in isolated domains is independent of the actin-based cytoskeleton organization. Lastly, when the actin-based cytoskeleton confinement processes are relaxed, the contribution of lipid-dependent microdomains to confining transmembrane proteins was also readily observed. Overall, our data provide strong evidence supporting the idea that in live cells, a lipid-dependent microdomain organization is responsible for the dynamic molecular confinement of membrane components.

FCS diffusion laws provide a robust experimental frame of analysis for investigating the presence of submicron domains in live cells

Among the methods used to characterize the cell membrane, our novel experimental approach constitutes a significant advance, since it can be used to quantify relevant parameters to explore domain structure in the plasma membrane. Although FRAP and FCS methods involve similar experimental setups, the FCS method provides unique information, mainly because it combines high temporal resolution with single molecule sensitivity and robust statistical analysis (Schwille *et al*, 1999; Bacia *et al*, 2004). By comparison, the FRET methods frequently used to study membrane domains probe direct molecular interactions (Kenworthy and Edidin, 1998; Sharma *et al*, 2004), but these methods are not appropriate for studying long-range interactions and diffusive processes. SPT certainly competes with FCS, since it can be used to determine particle positions to within tens of nm and

in some cases, with a high temporal resolution (Schutz *et al*, 2000; Fujiwara *et al*, 2002). However, accurate interpretation of the SPT results generally requires analyzing large numbers of individual trajectories. Besides, in our FCS experiments, the direct conjugation of the fluorophore on the tracked molecules circumvents unwanted crosslinking and aggregation. Overall, the FCS approach described here for recording measurements on different spatial scales provides a highly appropriate means of exploring domain structure and dynamics in the plasma membranes of live cells.

The diffusion behavior of different subclasses of membrane components was determined here experimentally. Although the sphingolipid analogs show a lower affinity for DRMs than their natural counterparts (our data and Kuerschner *et al*, 2005), they are still useful to probe lipid raft organization, since FCS is sufficiently sensitive to be able to detect even small amounts of the fluorescent molecules in the coexisting phase (Korlach *et al*, 1999). The wide range of time intercepts t_0 measured (from -20 to $+20$ ms) suggests that different mechanisms may hinder the diffusion of membrane components. Based on our previous simulations (Wawreziniecki *et al*, 2005), these findings indicated that a strictly positive time intercept t_0 resulted from confinement into isolated domains, whereas a strictly negative value reflected the presence of a meshwork. It is significant that the components thought to be associated with lipid rafts, such as GPI-anchored proteins or sphingolipid analogs, showed strictly positive time intercepts, which suggests that a dynamic process of molecular partition into discrete domains mainly hinders their diffusion. By contrast, barriers predominantly impede the diffusion of the TfR-GFP since t_0 was strictly negative. Owing to the null t_0 , the glycerophospholipid analogs apparently underwent unhindered diffusion.

Evidence supporting a lipid-dependent microdomain organization in live cells

A clearly visible signature of lipid-dependent compartmentalization is provided by COase and SMase enzymatic treatments. Our finding is consistent with previous data showing that both cholesterol and SM make a pivotal structural contribution to order domain formation (Brown and London, 1998; Rietveld and Simons, 1998). These results indicate that the lipid-dependent microdomain organization dictates the overall mobility of sphingolipid analogs and GPI-anchored proteins. It is also worth pointing out that the microdomains detected in the present study do actually exist in the plasma membrane of cells under steady-state conditions. This observation is in line with recently published data showing that phase separation and the formation of lipid domains do in fact occur in live cells (Meder *et al*, 2006).

Although an actin-based system of cytoskeleton compartmentalization has been described in the case of molecules located in the outer leaflet of the plasma membrane (Sako and Kusumi, 1994; Fujiwara *et al*, 2002; Kusumi *et al*, 2005), no such system was observed here in the mode of confinement of GPI-anchored proteins or sphingolipid analogs. Indeed, although cholesterol and SM modifications completely abolished the membrane confinement for these molecules, neither the actin-based cytoskeleton disorganization nor its stabilization had any such effects. Further studies are now required to determine whether the above discrepancies

may be attributable to differences in the cell types, experimental conditions or techniques used. Our results are nevertheless in agreement with those of SPT analyses performed on GPI-anchored MHC class I and DiI molecules (Vrljic *et al*, 2005) as well as with the finding that cholesterol and/or SM modifications reduced the molecular mobility (Kenworthy *et al*, 2004; Nishimura *et al*, 2005; Vrljic *et al*, 2005).

The free diffusion behavior observed in the case of the glycerophospholipid analogs is similar to that previously observed in the case of Cy3-DOPE in the plasma membrane of various cell types at a recording rate of 100 ms/frame (Fujiwara *et al*, 2002; Kusumi *et al*, 2005). However, we were unable to detect any submicron-sized compartments such as those previously observed by authors performing SPT at an enhanced time resolution (25 μ s/frame) using gold-tagged Cy3-DOPE molecules to label COS-7 cells (Kusumi *et al*, 2005).

A lipid-dependent microdomain organization also impedes the diffusion of transmembrane proteins

Our data clearly confirm the existence of fences confining transmembrane proteins, even if these molecules are not interacting directly with the cytoskeleton. For instance, the motion of TfR-GFP is mainly controlled by the actin-based membrane skeleton fences, and t_0 decreased when this meshwork was strengthened. It is also worth noting that all these experimental FCS diffusion laws form a bundle of lines with a common crossover point (Figure 7D). Previous simulations have shown that (i) these lines intersect at a single point in the meshwork at different barrier strengths but with the same mesh sizes; (ii) the crossover occurs when the spot area is about one to twice that of the mesh. Since the experimental crossover was obtained with $w^2 = 5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ nm², the area of the mesh was around $8 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$ nm². Assuming a square mesh, its sides would measure 240 ± 60 nm: this value is in good agreement with the 260 nm mesh size measured in rat kidney fibroblasts, which was determined by SPT experiments performed at 25 μ s/image (Fujiwara *et al*, 2002). However, in our case, we did not detect any enlarged meshes after a partial disruption of the cytoskeleton. In addition, we observed that a treatment by cytochalasin D at 10 μ M released TfR-GFP and DPP_{IV}-GFP proteins from the meshwork-based state of confinement. Nevertheless, the latter proteins still underwent the lipid domain-based constrained diffusion on a much smaller compartmentalization scale.

Some extremely interesting features have been brought to light by monitoring the motion of these proteins after subjecting them to treatments that disrupt the actin-based cytoskeleton and/or decrease the membrane cholesterol level. This combined treatment applied here induced the recovery of an FCS diffusion law curve, which intercepted the time origin. A single treatment abolishing one of the two major hindrance mechanisms served to show up the other one.

Main features of lipid-dependent microdomains

Our observations of the sphingolipid and cholesterol dependency for the lipid-dependent microdomains revealed by the FCS diffusion study suggest that they correspond to lipid rafts, a type of microdomains proposed to be involved in numerous cellular functions, but whose existence has been matter of controversy. The current view is that 'membrane

rafts are small (10–200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes' (Pike, 2006). The analysis of our experimental data in the light of the simulation studies allow us to further conclude that the lipid-mediated microdomains described here fit the above description very nicely in many respects.

As mentioned above, our FCS method is sensitive to nanoscale confining structures. Based on dynamic molecular partition simulations, we were able to determine the upper limit of the microdomain radius r (Supplementary Figure S1). We previously observed that the graph line between τ_d and w^2 is solely observed if the observation spot is significantly larger than the domains ($w^2/r^2 > 10$ in the case of isolated microdomains) (Wawrezynieck *et al*, 2005). In our experiments, the smallest observation spot was close to the transverse resolution limit of the microscope (~ 200 nm); the upper limit of the microdomain radius r is therefore around 60 nm: this value is consistent with data published in the literature (Pralle *et al*, 2000; Zacharias *et al*, 2002; Prior *et al*, 2003; Sharma *et al*, 2004).

The t_0 intercept could be of special interest, since it could be used to delineate the temporal characteristics of these microdomains. In the simulation models, this value depends on both the partition factor α of a given molecule in the microdomains and the confinement time within one microdomain τ_{conf} (see equation (2) in the Supplementary data). The value of α is not yet available, but based on DRM experiments, we might tentatively take this value to range between 10 and 30%. For instance, with a t_0 value of 18.4 ms in the case of GFP-Thy1, we have $31 \text{ ms} < (\tau_{\text{conf}} - \tau_d^{\text{domain}}) < 92 \text{ ms}$. Since we measured that $\tau_d > 30 \text{ ms}$ when $(w/r)^2 > 10$, the diffusion time in a domain should be at most $30/10 \sim 3 \text{ ms}$. It can therefore be concluded that τ_{conf} ranges between 34 and 95 ms. Confinement in microdomains is therefore an extremely transient process taking probably only some tens to hundreds of milliseconds. Reaching a deeper understanding of t_0 obviously constitutes one of most important and challenging issues awaiting future theoretical analysis. Our experiments showed (Figures 5 and 6) that before reaching the maximum effect (i.e. $t_0 \sim \text{null}$), a parallel existed between the change in the sphingomyelin or cholesterol levels and the decrease in t_0 . It is therefore possible to consider this parameter as a *microdomain confinement index*, since the partition factor α and the confinement time τ_{conf} are essential parameters characterizing the confinement into microdomains.

We would like to stress the fact that our results do not tell us whether membrane molecules partition dynamically into pre-existing raft domains or whether they directly participate in assembly/disassembly of the domains forming self-promoting membrane complexes. This is because the confinement time τ_{conf} is always to be either shorter than or equal to the lifetime of the microdomain in our models. In the first case, the molecule is partitioning dynamically into a pre-existing domain, whereas in the second case, the molecule accompanies/participates in the assembly and disassembly of the domain. In the same context, we observed in our FCS measurements that the diffusion time τ_d remained constant within the limits of the experimental error bars although the amount of fluorescent probe used varied by a factor of 20 (i.e. from ~ 100 to $\sim 2000 \mu\text{m}^{-2}$ in the case of GFP-GPI)

(Supplementary Figure S2). Consequently, the probe concentration does not greatly affect the diffusion behavior of the probe. However, this is not relevant to the question as to whether we are dealing with pre-existing or self-assembling raft models, because our FCS analysis did not include the probe density, contrary to recent FRET and immuno-EM studies on nanoscale membrane organization (Sharma *et al*, 2004; Hess *et al*, 2005; Plowman *et al*, 2005).

Overall, our data strongly support a dynamic picture where nanometer-scale microdomains confine constituents for up to a few tens to hundreds of milliseconds and undergo continuous changes as molecular diffusion processes occur. These findings also show that studies on diffusion behavior throw particularly useful light on the modes of lateral membrane organization, which are likely to be largely governed by weak molecular interactions.

Materials and methods

DNA constructs and cell transfection procedures

GFP-GPI was provided by A LeBivic (IBDM, Marseille, France). DPP_{IV}-GFP was obtained from G Trugnan (INSERM, Paris, France). The human TfR cDNA was provided by S Mèresse (CIML, Marseille, France). The Thy1 gene expression vector and the Alexa488-conjugated anti-Thy1 Fab fragment were a kind gift from R Morris (King's College London, UK). To construct GFP-Thy1, three overlapping fragments were PCR amplified and cloned into the pEGFP-C1 plasmid. This yielded a recombinant GFP-Thy1 cDNA encoding the 19th aa of Thy1 (signal peptide), the EGFP and the remaining sequence of Thy1 (aa 20–162). To construct TfR-GFP, the TfR cDNA (aa 1–112) was cloned inframe with the GFP cDNA into the pEGFP-N3 plasmid.

All experiments were carried out on COS-7 cells (ATCC, CRL-1657). Cells were grown in DME supplemented with 10% FCS, glutamine and sodium pyruvate. Transient transfections were performed with ExGen 500 as per the manufacturer's instructions (Euromedex) and 24 h before FCS measurements.

Fluorescent staining with lipid analogs

Complexes of BODIPY-lipids (Invitrogen) and BSA were prepared in line with the manufacturer's instructions and as described in Martin and Pagano (1994). Briefly, 500 nmol of FL-SM or FL-GM1 stock solution (CHCl₃:MeOH 19:1) were dried under a stream of nitrogen, and then under a vacuum for at least 1 h. The dried lipid was dissolved in 200 μl of absolute ethanol and injected into 10 ml of defatted BSA solution (5 μM defatted BSA in Hanks buffered salt solution containing 10 mM HEPES pH 7.4, HBSS/HEPES) while vortexing vigorously. FL-PC and FL-PE were prepared in a similar way, except that the lipid to BSA ratio was 2:1 (mol:mol). Cell cultures were washed in HBSS/HEPES, incubated with 0.05 μM lipid/BSA complex in HBSS/HEPES for 30 min at 4°C, washed and further incubated in HBSS/HEPES at 37°C.

Treatment of cells with enzymes and drugs

To modify the cholesterol or sphingomyelin contents of plasma membrane, cells were treated with *Streptomyces* sp. COase or *Staphylococcus aureus* SMase (Calbiochem) in serum-free HBSS/HEPES buffer at 1 U/ml for 30 min or at 0.1 U/ml for 5 min, respectively. Cells were washed in HBSS/HEPES prior to the diffusion measurements. Prior to pharmacological treatments, cells were washed in HBSS/HEPES and incubated at 37°C with 1 μM latrunculin B (5 min), 2–10 μM cytochalasin D (30 min) or 0.4 μM jasplakinolide (5 min). All FCS measurements were completed within 30 min of the cell treatment, before any significant morphological changes in the cell could take place.

Biochemical analyses

To determine the cholesterol levels, cells were scraped off and lysed at 4°C for 30 min in a buffer containing 1% Nonidet P-40, 10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and protease inhibitors. Samples were cleared by centrifugation at a rate of 12 000 g before

undergoing fluorometric measurements using the Amplex[®]Red Cholesterol kit (Invitrogen).

To determine the sphingomyelin levels, a similar procedure was used, except that the cells were lysed at 4°C by sonication and the PNS harvested by centrifugation. Lipid extraction was performed using the Bligh–Dyer method (Bligh and Dyer, 1959) and the sphingomyelin levels were determined using a fluorometric method with the Amplex[®]Red sphingomyelinase assay kit (Invitrogen) as described in He *et al* (2002). With each test sample, a negative control assay was run on the sample and the reaction mixture devoid of SMase. Sphingomyelin amounts were calculated from the difference in fluorescence between the test and control samples, and compared with a standard.

To isolate DRMs, Brij98 (1%) solubilized postnuclear supernatant was fractionated on the sucrose gradient by centrifugation at 38 000 r.p.m. for 16 h in a SW41 rotor (Beckman Instruments Inc.) (Drevot *et al*, 2002). Fractions were resolved on SDS–PAGE and blotted with anti-GFP mAbs (Roche Molecular Biochemicals). The presence of DRMs was monitored, based on the distribution of Rab5 and ganglioside G_{M1} over the sucrose gradient. Spectrofluorimetry measurements were performed on the different fractions of the lipid analysis.

References

- Bacia K, Scherfeld D, Kahya N, Schwille P (2004) Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. *Biophys J* **87**: 1034–1043
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917
- Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 111–136
- Drevot P, Langlet C, Guo XJ, Bernard AM, Colard O, Chauvin JP, Lasserre R, He HT (2002) TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J* **21**: 1899–1908
- Edidin M (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**: 257–283
- Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* **157**: 1071–1081
- Gaus K, Gratton E, Kable EP, Jones AS, Gelissen I, Kritharides L, Jessup W (2003) Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15554–15559
- He X, Chen F, McGovern MM, Schuchman EH (2002) A fluorescence-based, high-throughput sphingomyelin assay for the analysis of Niemann–Pick disease and other disorders of sphingomyelin metabolism. *Anal Biochem* **306**: 115–123
- Hess ST, Kumar M, Verma A, Farrington J, Kenworthy A, Zimmerberg J (2005) Quantitative electron microscopy and fluorescence spectroscopy of the membrane distribution of influenza hemagglutinin. *J Cell Biol* **169**: 965–976
- Kenworthy AK, Edidin M (1998) Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol* **142**: 69–84
- Kenworthy AK, Nichols BJ, Rimmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, Lippincott-Schwartz J (2004) Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol* **165**: 735–746
- Korlach J, Schwille P, Webb WW, Feigensohn GW (1999) Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8461–8466
- Kuerschner L, Ejsing CS, Ekroos K, Shevchenko A, Anderson KI, Thiele C (2005) Polyene-lipids: a new tool to image lipids. *Nat Methods* **2**: 39–45
- Kusumi A, Ike H, Nakada C, Murase K, Fujiwara T (2005) Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Semin Immunol* **17**: 3–21
- Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J* [E-pub ahead of print: 22 June 2006; doi:10.1038/sj.emboj.7601204]
- Marguet D, Spiliotis ET, Pentcheva T, Lebowitz M, Schneek J, Edidin M (1999) Lateral diffusion of GFP-tagged H2Ld molecules and of GFP-TAP1 reports on the assembly and retention of these molecules in the endoplasmic reticulum. *Immunity* **11**: 231–240
- Martin OC, Pagano RE (1994) Internalization and sorting of a fluorescent analogue of glucosylceramide to the Golgi apparatus of human skin fibroblasts: utilization of endocytic and non-endocytic transport mechanisms. *J Cell Biol* **125**: 769–781
- Meder D, Moreno MJ, Verkade P, Vaz WL, Simons K (2006) Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 329–334
- Megha, London E (2004) Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* **279**: 9997–10004
- Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**: 377–388
- Nishimura SY, Vrljic M, Klein LO, McConnell HM, Moerner WE (2005) Cholesterol depletion induces solid-like regions in the plasma membrane. *Biophys J* **90**: 927–938
- Pike LJ (2006) Rafts defined. *J Lipid Res* [E-pub ahead of print: 27 April 2006; doi:10.1194/jlr.E600002-JLR200]
- Plowman SJ, Muncke C, Parton RG, Hancock JF (2005) H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15500–15505
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* **148**: 997–1008
- Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF (2003) Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* **160**: 165–170
- Rietveld A, Simons K (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* **1376**: 467–479
- Sako Y, Kusumi A (1994) Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J Cell Biol* **125**: 1251–1264
- Saxton MJ (2005) New and notable: fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* **89**: 3678–3679
- Schutz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H (2000) Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* **19**: 892–901
- Schwille P, Haupts U, Maiti S, Webb WW (1999) Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys J* **77**: 2251–2265

Fluorescence microscopy, FCS measurements and numerical analysis

Details of the experimental fluorescence microscopy, FRAP, FCS and numerical analysis procedures used are given in the Supplementary data, as well as in previous studies (Kenworthy *et al*, 2004; Wawrezinieck *et al*, 2004, 2005).

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

Acknowledgements

We thank R Morris, M Edidin, A Lellouch and P Golstein, for helpful discussions and suggestions and for critically reviewing the manuscript, J Blanc for editing the English. R Morris, A LeBivic, G Trugnan and S Méresse generously provided reagents and the use of the PICsL imaging core facility and technical assistance. This research was supported by institutional grants from INSERM and CNRS, and by specific grants from FRM, MENRT, EU FEDER and CNRS. LW and FC have been awarded fellowships from the MENRT.

- Sharma P, Varma R, Sarasij RC, Ira, Gousset K, Krishnamoorthy G, Rao M, Mayor S (2004) Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* **116**: 577–589
- Shvartsman DE, Kotler M, Tall RD, Roth MG, Henis YI (2003) Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts. *J Cell Biol* **163**: 879–888
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569–572
- Simons K, Vaz WL (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 269–295
- van Meer G (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J* **24**: 3159–3165
- Vrljic M, Nishimura SY, Moerner WE, McConnell HM (2005) Cholesterol depletion suppresses the translational diffusion of class II major histocompatibility complex proteins in the plasma membrane. *Biophys J* **88**: 334–347
- Wawrezynieck L, Lenne P-F, Marguet D, Rigneault H (2004) Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws: application to live cell membranes. *Proc SPIE* **5462**: 92–102
- Wawrezynieck L, Rigneault H, Marguet D, Lenne P-F (2005) Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J* **89**: 4029–4042
- Xu X, London E (2000) The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* **39**: 843–849
- Yechiel E, Edidin M (1987) Micrometer-scale domains in fibroblast plasma membranes. *J Cell Biol* **105**: 755–760
- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**: 913–916

5.2.2 Le photoblanchiment mesuré dans les cellules COS-7

La puissance d'excitation utilisée dans les expériences réalisées ici est suffisamment faible pour que le photoblanchiment soit négligeable. Nous avons vérifié que le temps de diffusion mesuré n'est pas modifié lorsque la puissance d'excitation est légèrement augmentée ou légèrement diminuée.

Nous travaillons à puissance d'excitation constante, quelle que soit la taille du volume confocal. Or le nombre de photons moyen émis pendant un intervalle dt par un fluorophore est proportionnel à l'intensité absorbée par ce fluorophore. Lorsqu'il traverse une surface d'aire S , et s'il diffuse librement avec un coefficient de diffusion D , le fluorophore émet donc un nombre de photons moyen proportionnel à :

$$N_{\text{photons}} \propto \int_S I_{\text{exc}}(\vec{r}) dS = P_{\text{exc}} . \quad (5.1)$$

Ceci signifie qu'à puissance d'excitation égale, un fluorophore diffusant librement ne sera pas plus photoblanchi lorsqu'il traverse un grand volume confocal qu'un petit volume confocal. L'étude du photoblanchiment peut alors se faire à un *waist* quelconque.

Lorsque le fluorophore ne diffuse pas librement, l'étude du photoblanchiment est réalisée dans le cas le plus défavorable, c'est-à-dire pour le *waist* pour lequel le rapport du temps de diffusion divisé par le *waist* au carré est le plus élevé. Pour les lois de diffusion linéaires avec une intersection positive, l'étude est réalisée pour le plus petit *waist* que l'on peut obtenir. Au contraire, pour les lois de diffusion linéaires avec une ordonnée à l'origine négative, l'étude est réalisée pour le plus grand *waist* avec lequel nous travaillons.

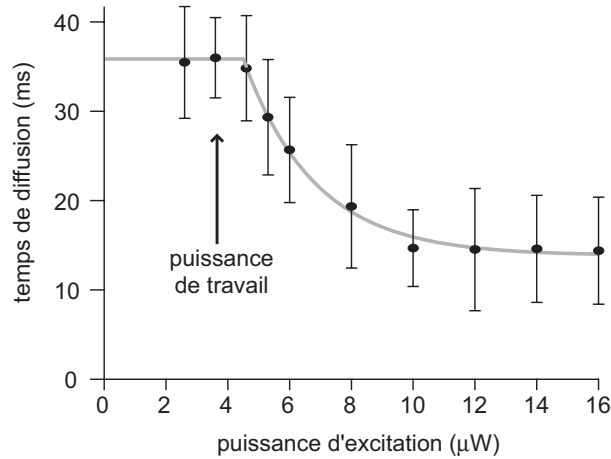


FIG. 5.12 – Étude du photoblanchiment dans les cellules COS-7.

Temps de diffusion de $FL-G_{M1}$ pour le plus petit *waist* accessible mesuré pour différentes puissances d'excitation. L'ajustement choisi est une constante pour $P_{\text{exc}} < P_0$ et une exponentielle décroissante pour $P_{\text{exc}} > P_0$. La puissance de travail que nous avons choisie ($P_{\text{exc}} = 3.6 \mu W$) est indiquée par une flèche.

La figure 5.12 montre la courbe représentative du temps de diffusion de FL-G_{M1} en fonction de la puissance d'excitation mesurée à l'entrée de l'ouverture arrière de l'objectif de microscope. La puissance d'excitation choisie pour travailler est un compromis : d'une part, elle doit être suffisamment petite pour pouvoir négliger le photoblanchiment et mesurer un temps de diffusion qui ne soit pas diminué artificiellement par un trop grand nombre de fluorophores s'éteignant avant d'avoir traversé entièrement le volume confocal ; d'autre part, elle doit être la plus grande possible afin d'optimiser le rapport signal sur bruit du système.

5.2.3 Effet de la température

L'effet de la température sur la diffusion membranaire a été étudié en mesurant les lois de diffusion à température physiologique (37°C) ainsi qu'à température ambiante (25°C).

On n'observe aucune modification des lois de diffusion dans le cas des différents lipides étudiés et des deux protéines attachées à la membrane par une ancre GPI (voir figure 5.13). Notamment, FL-G_{M1}, FL-SM, GPI-GFP et Thy1-GFP montrent exactement le même comportement caractéristique d'un confinement transitoire dans des domaines isolés.

Le confinement dans les microdomaines lipidiques n'est donc pas dépendant de la température. Cette caractéristique les rapproche des zones de confinement transitoire (TCZs) décrites par Jacobson et Kusumi (voir section 1.4.3).

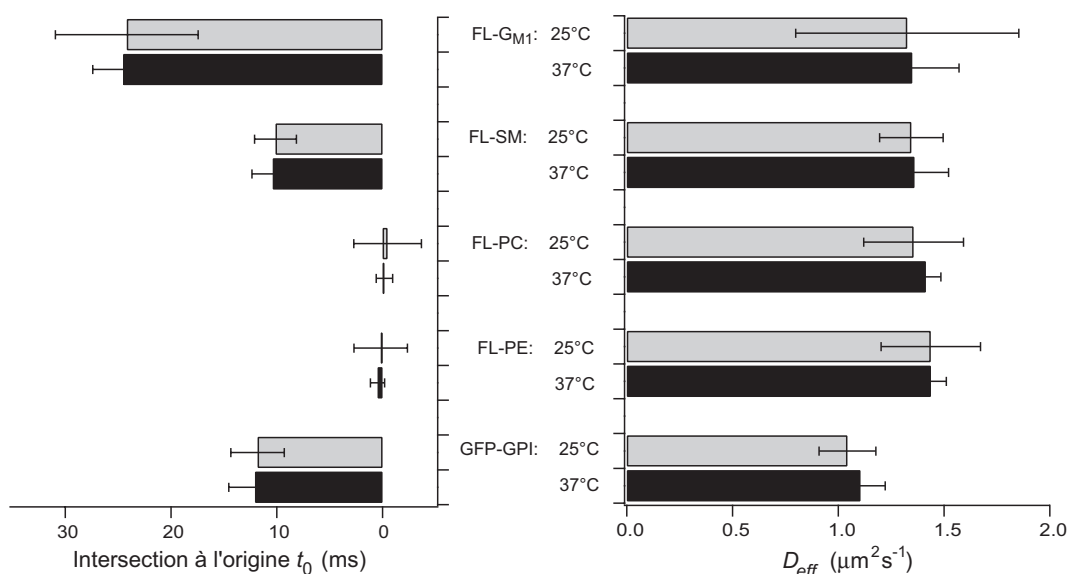


FIG. 5.13 – Effet de la température sur la diffusion membranaire des lipides et des protéines ancrées GPI dans les COS-7.

La diffusion des lipides et de la protéine ancrée GPI est inchangée par la diminution de température de 37°C à 25°C. La modification de la loi de diffusion est très sensible pour les deux protéines transmembranaires.

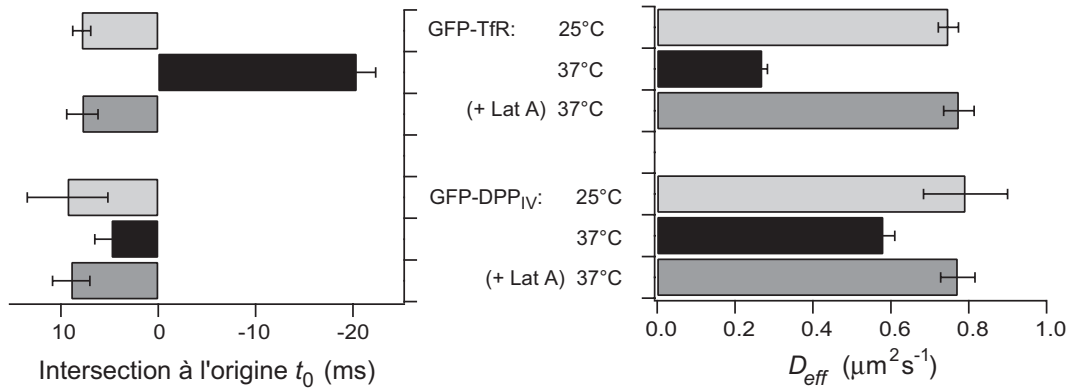


FIG. 5.14 – Effet de la température sur la diffusion membranaire des protéines transmembranaires dans les COS-7.

La diffusion des lipides et de la protéine ancrée GPI est inchangée par le changement de température de 25°C à 37°C. La modification de la loi de diffusion est très sensible pour les deux protéines transmembranaires lors de la diminution de température de 37°C à 25°C. La loi de diffusion obtenue à 25°C est identique à celle obtenue à 37°C après traitement du cytosquelette par la Latrunculine A.

Au contraire, les lois de diffusion mesurées pour les deux protéines transmembranaires TfR-GFP et DPP_{IV}-GFP dans les COS-7 sont modifiées de façon sensible (voir figure 5.14). Notamment, l'ordonnée à l'origine de la droite représentative de la loi de diffusion de TfR-GFP est positive à 25°C, et négative à 37°C. De plus, le comportement à 25°C des deux protéines transmembranaires est identique à celui obtenu à 37°C après traitement du cytosquelette par la cytochalasine D à une concentration de 10 μM . Or, il a été vu dans la section 5.2 que la diffusion des protéines transmembranaires n'est plus sensible à la présence du cytosquelette après un tel traitement. Il semble donc que le cytosquelette ne soit pas impliqué dans le comportement diffusionnel des composantes membranaires à 25°C.

La même observation a été réalisée sur un autre type cellulaire : les cellules 3A9. La diffusion d'une protéine transmembranaire (la chaîne ζ de la protéine CD3) est étudiée. On observe, de la même façon que pour les cellules COS-7, que le confinement dû au cytosquelette n'est sensible qu'à 37°C.

La présence du cytosquelette n'est donc sensible qu'à température physiologique. Plusieurs explications sont possibles :

- rétractation du cytosquelette à 25°C,
- fragilisation du cytosquelette à 25°C,
- modification de la dynamique de construction/rupture des microfilaments,
- perte d'une interaction entre des protéines d'ancrage et le cytosquelette : le cytosquelette s'éloigne de la membrane.

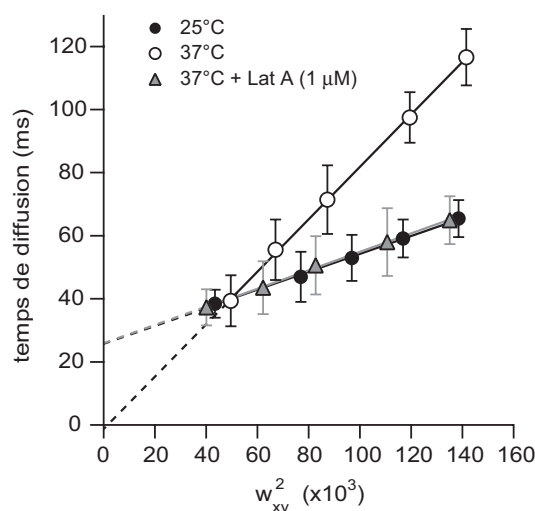


FIG. 5.15 – Effet de la température sur la diffusion membranaire dans les 3A9. La loi de diffusion de ζ -YFP est modifiée par un changement de température de 37°C à 25°C. La loi de diffusion obtenue à 25°C est identique à celle à 37°C en présence de latrunculine A à 1µM.

5.2.4 Effet du crosslinking de G_{M1}

De nombreuses équipes réalisent des mesures de diffusion sur G_{M1} en utilisant la toxine B du choléra (*Cholera Toxin B*).

La sous-unité B de la toxine du choléra (CTB, pour *Cholera Toxin B*)

La toxine du choléra comprend deux sous-unités, notées A et B, arrangées en AB_5 . La sous-unité B n'est pas toxique. La protéine hexamérique est en revanche responsable des symptômes produits par une infection au vibron cholérique. (*Vibrio cholerae*). Dans les premières étapes de l'infection cellulaire, la sous-unité B de la toxine se lie spécifiquement au fragment pentasaccharidique de la protéine G_{M1} située sur la surface des cellules épithéliales de l'intestin humain.

La CTB comporte cinq sites de fixation pour les protéines G_{M1} (figure 5.16). Généralement, seules trois protéines G_{M1} se lient à une sous-unité CTB pour des raisons d'encombrement stérique.

Afin de vérifier l'impact de la formation de ponts entre plusieurs molécules G_{M1} , nous pouvons utiliser de la CTB non marquée, mais aussi de la CTB marquée : Alexa488-CTB.

Expériences réalisées sur G_{M1} et GPI

L'ajout de CTB marquée et/ou non marquée est réalisé en suivant le protocole de la section A.5.

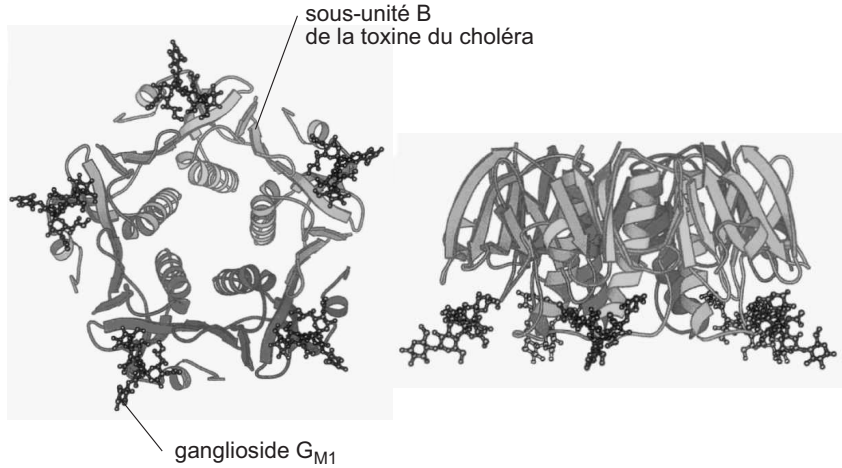


FIG. 5.16 – Sous-unité B de la toxine du choléra et ganglioside G_{M1} . D'après [Merritt 94]

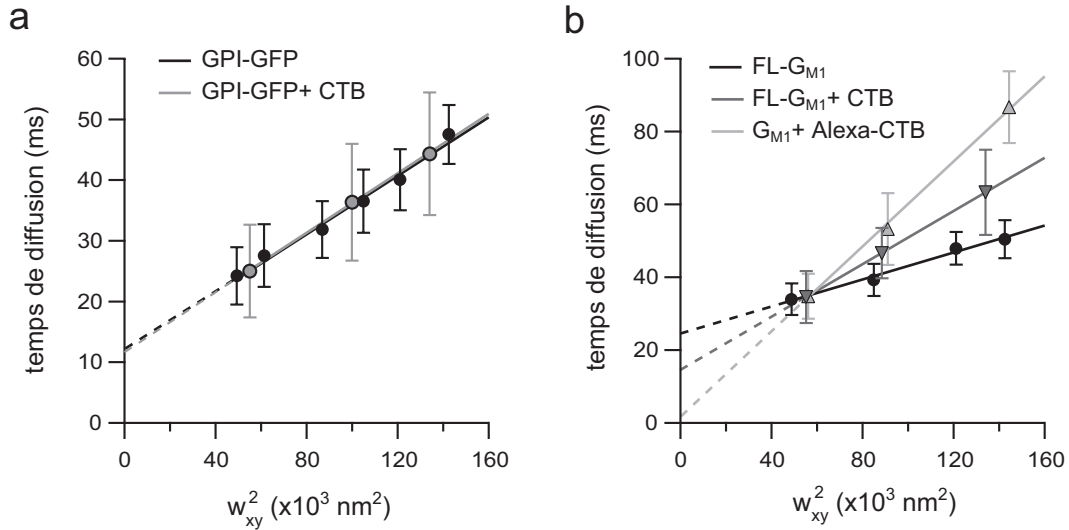


FIG. 5.17 – Effet de la CTB sur les lois de diffusion de GPI-GFP et FL- G_{M1} .

G_{M1} et Alexa₄₈₈-CTB Une première expérience est réalisée en ajoutant de CTB non marquée (100 nM) et de Alexa₄₈₈-CTB (10 nM). Les mesures FCS permettent donc d'étudier la diffusion des complexes Alexa₄₈₈-CTB+ G_{M1} . La loi de diffusion FCS obtenue est une droite passant par l'origine, aux incertitudes de mesure près (figure 5.17b). Une loi de diffusion normale peut en particulier être expliquée par la diffusion libre du complexe fluorescent ou par la diffusion à l'extérieur d'obstacles imperméables.

Une diffusion libre signifie donc la suppression du confinement dans les microdomaines, mais il nous est à cette étape impossible de déterminer si Alexa₄₈₈-CTB+ G_{M1} peut entrer plus ou moins librement dans les radeaux lipidiques, s'il en est totalement

exclu, ni même si les radeaux lipidiques sont toujours présents après ajout de CTB.

GPI-GFP et CTB Afin d'affiner notre compréhension de ce qui se produit lors de l'ajout de la CTB, nous étudions également la diffusion de GPI-GFP en présence de CTB non marquée (100 nM). La loi de diffusion FCS apparaît comme étant indépendante de l'ajout de CTB. L'ordonnée à l'origine reste de l'ordre de $11,5 \pm 1,0$ ms : le confinement à l'intérieur des radeaux lipidiques n'a donc pas disparu.

FL-G_{M1} et CTB L'absence de confinement de G_{M1} complexé avec la CTB n'est donc pas expliqué par la suppression des radeaux lipidiques. Un tel comportement pourrait s'expliquer par une exclusion de G_{M1} des radeaux lipidiques dès lors qu'il est complexé avec la CTB. Des raisons d'encombrement stérique pourraient très bien justifier une telle exclusion. Cette hypothèse est également compatible avec les autres manipulations réalisées sur les cellules COS-7. Un ajout de CTB non marquée a été réalisé sur des cellules marquées par FL-G_{M1} : certaines molécules G_{M1} et FL-G_{M1} vont donc être réticulées par la CTB. Mais l'étude de la diffusion porte sur FL-G_{M1} : sont étudiées à la fois les analogues lipidiques fluorescents FL-G_{M1} seuls et les complexes FL-G_{M1}-CTB. Il apparaît alors que la loi de diffusion obtenue est intermédiaire entre les lois de diffusion mesurées pour FL-G_{M1} et Alexa₄₈₈-CTB+G_{M1}.

Il est vraiment important de noter que le comportement de FL-G_{M1} est très différent de celui de Alexa₄₈₈-CTB+G_{M1}, notamment pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux des équipes qui travaillent sur G_{M1} réticulé. Les conclusions peuvent être radicalement différentes !

Il est vraisemblable que si G_{M1} entre et reste confinée transitoirement dans les radeaux lipidiques, la réticulation par la sous-unité B de la toxine cholérique exclut G_{M1} de ces mêmes radeaux lipidiques.

Néanmoins, on ne peut pour l'instant écarter l'explication selon laquelle la réticulation des G_{M1} provoque l'agrégation de plusieurs radeaux lipidiques. En effet, la diffusion de FL-G_{M1} dans de tels agrégats peut devenir suffisamment lente pour ne pas pouvoir être mesurée ; la FCS ne serait alors plus sensible qu'à la diffusion des FL-G_{M1} non réticulés et diffusant en dehors des radeaux lipidiques.

Une étude de la fraction mobile par FRAP pourrait permettre de lever l'ambiguïté.

5.2.5 Échange ou confinement ?

D'autres modèles permettent d'expliquer l'obtention d'une loi de diffusion qui est une droite avec une ordonnée à l'origine positive.

Si les molécules fluorescentes diffusent librement dans la membrane, la loi de diffusion est une droite passant par l'origine. Si les molécules peuvent intégrer la membrane ou s'en extraire par des échanges entre le cytoplasme et la membrane, le temps de diffusion est indépendant de la taille du waist transverse w_{xy} . Comme

expliqué dans le paragraphe 1.4.3, si les molécules peuvent à la fois diffuser librement dans les deux directions x et y de la membrane, et intégrer ou s'extraire de la membrane (mouvement selon la direction z), la loi de diffusion devient une droite avec une ordonnée à l'origine positive, quelle que soit la valeur du waist.

Il est possible de faire la différence entre une loi de diffusion FCS correspondant à du confinement et une loi correspondant à de l'échange si les mesures sont possibles à petites valeurs de waists (voir figure 5.18).

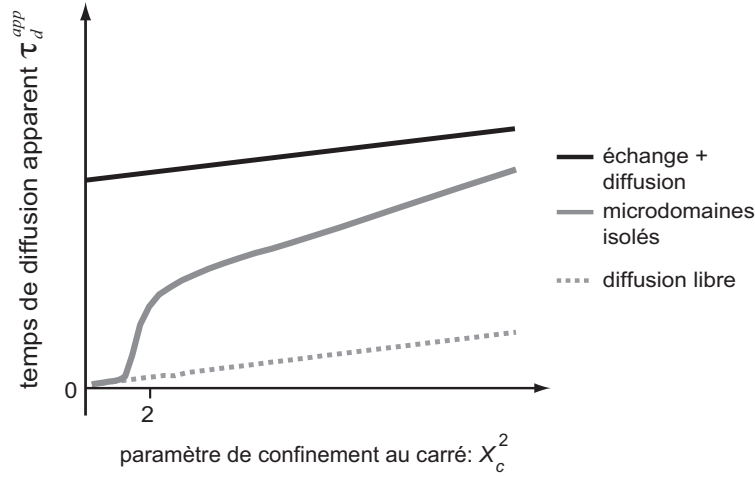


FIG. 5.18 – Lois de diffusion FCS correspondant à une mesure de confinement transitoire ou d'échange entre la membrane et le cytoplasme.

Dans le cas d'un confinement transitoire dans des domaines isolés, la loi de diffusion n'est une droite que pour de grandes valeurs de waists. Dans le cas d'échanges possibles entre la membrane et le cytoplasme, la loi de diffusion est une droite avec une ordonnée à l'origine positive quelle que soit la valeur du waist.

Notre équipe a réalisé la mesure des temps de diffusion pour des petits waists à l'aide de nanotrous [Wenger 06]. Elle utilise une ouverture unique de taille inférieure à la longueur d'onde, son rayon étant compris entre 50 et 250 nm. De telles ouvertures limitent la surface observée de la membrane cellulaire à une aire inférieure à celle correspondant à la limite de diffraction. Cette amélioration permet de dessiner les lois de diffusion FCS pour des waists inférieurs à 180 nm et donc de compléter les lois de diffusion obtenues jusqu'ici.

De telles mesures réalisées pour l'analogue lipidique FL-G_{M1}, dont la loi de diffusion aux grands waists est une droite avec une ordonnée à l'origine positive, permettent de construire la loi de diffusion aux petits waists. Celle-ci permet d'interpoler un temps de diffusion nul pour un waist nul. L'ordonnée à l'origine positive peut alors être reliée à un confinement dans des domaines isolés. Ceci reste assez prévisible, FL-G_{M1} ne pouvant pas s'extraire de la membrane très facilement.

Néanmoins, d'autres molécules attachées à la membrane plasmique par des liaisons de plus faible énergie sont susceptibles de subir des échanges rapides et nombreux entre le cytoplasme et la membrane. C'est le cas de certaines protéines périphériques,

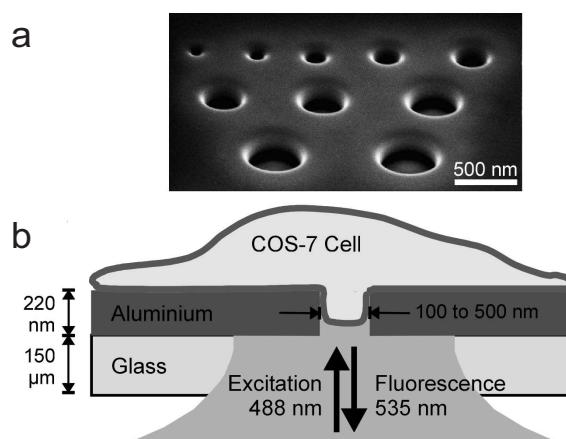


FIG. 5.19 – Principe de la mesure FCS à travers un nanotrou.

a) Image par microscopie électronique d'un ensemble de nanotrous de diamètres variés sous illumination oblique. On peut noter que, dans l'expérience, seul un nanotrou unique est utilisé. b) Disposition de l'échantillon. D'après [Wenger 06]

mais cela pourrait également être le cas de la molécule K-Ras, molécule de la famille Ras attachée au feuillet interne de la membrane par une ancre lipidique. Même pour des waists de l'ordre de 75 nm, on n'observe pas de décroissance notable du temps de diffusion par rapport à la droite affine obtenue à partir des mesures aux grands waists. Cela s'explique soit par l'existence de domaines isolés très petits (<25 nm de rayon), soit par des échanges rapides entre le cytoplasme et la membrane. Des études sont en cours afin de pouvoir répondre à cette question.

5.3 Cellules eucaryotes après un événement de signalisation

S'il est bien souvent admis que les radeaux lipidiques sont des structures très dynamiques et de taille réduite, une question subsiste au sein de la communauté des biophysiciens étudiant l'architecture de la membrane cellulaire : ces radeaux lipidiques existent-ils préalablement à un événement de signalisation ? D'après les résultats expérimentaux exposés ici, il semblerait que la réponse soit positive ; mais alors que se passe-t-il lors de l'activation de la cellule, qui puisse expliquer que certaines expériences ne peuvent détecter les radeaux lipidiques que lors de l'activation cellulaire ?

Nous avons travaillé sur deux lignées cellulaires, les cellules 3A9 et les cellules Jurkat, dont on sait qu'elles sont réactives chacune à un peptide donné. Ce travail a été mené en étroite collaboration avec l'équipe d'H.-T. He (CIML, Luminy), et notamment l'aide technique de O. Hawchar.

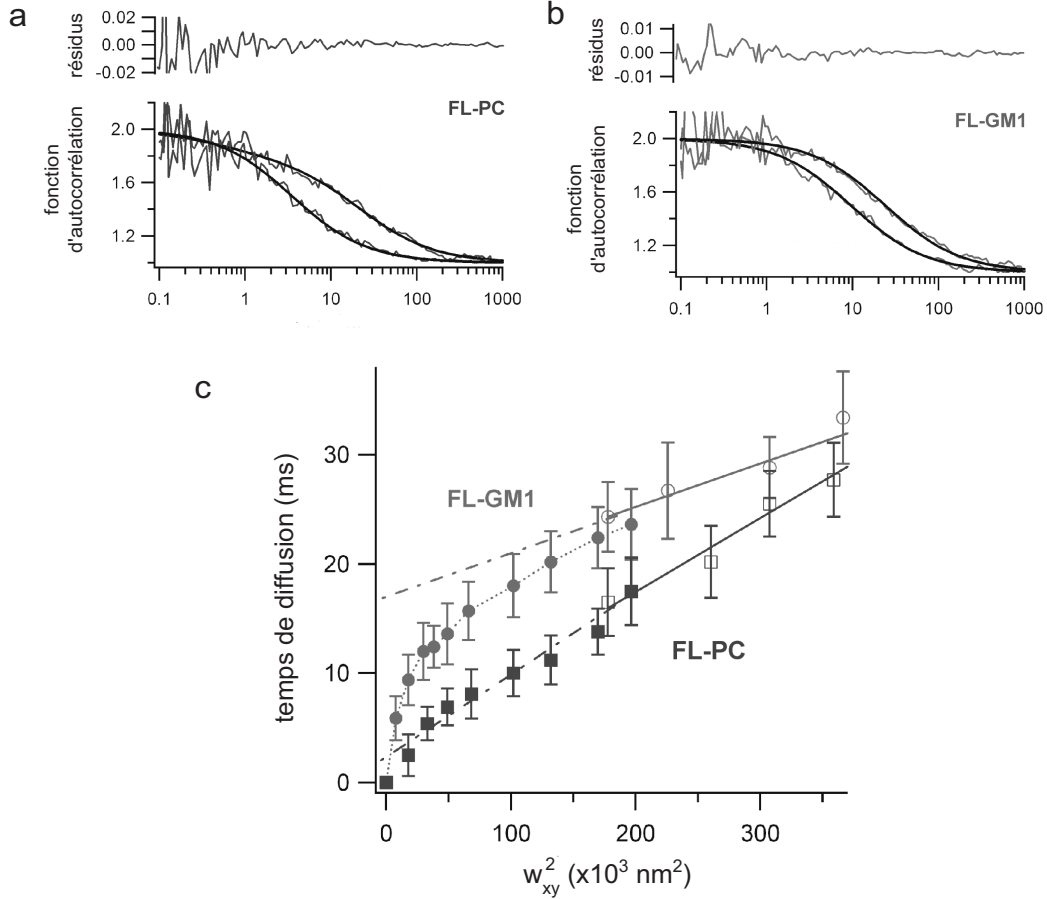


FIG. 5.20 – Lois de diffusion FCS complétées par des mesures de temps de diffusion aux petits waists pour les deux analogues lipidiques fluorescents FL-PC et FL-GM1.

a) ACFs normalisées et ajustements obtenus pour FL-PC en utilisant un faisceau de taille limitée par diffraction ou une ouverture de 75 nm de rayon. b) ACFs normalisées et ajustements obtenus pour FL-GM1 en utilisant un faisceau de taille limitée par diffraction ou une ouverture de 75 nm de rayon. c) Lois de diffusion FCS pour FL-PC (carrés) et FL-GM1 (cercles). Les marqueurs vides correspondent aux mesures effectuées avec un faisceau limité par diffraction tandis que les marqueurs pleins correspondent aux mesures réalisées à travers les nanotrous de rayons variés. D'après [Wenger 06]

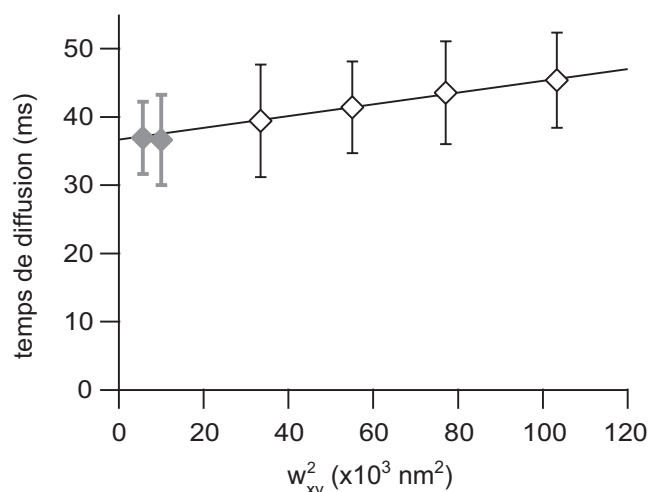


FIG. 5.21 – Lois de diffusion FCS complétées par des mesures de temps de diffusion aux petits waists pour GFP-K-Ras 4B.

Les marqueurs vides correspondent aux mesures effectuées avec le faisceau limité par diffraction tandis que les marqueurs pleins correspondent aux mesures réalisées à travers les nanotrous de rayons respectifs 75 et 100 nm. Mesures effectuées par Fabien Conchonaud et Jérôme Wenger.

Nous rappelons ici les interactions existant entre les différents acteurs d'un événement de signalisation.

Le récepteur des lymphocytes T (TCR, pour *T cell receptor*) est une glycoprotéine membranaire qui joue le rôle de récepteur pour l'antigène. Le TCR est un hétérodimère constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β (figure 5.22a). Il est associé à un complexe de protéines membranaires (complexe CD3) dont la fonction est de transmettre l'information reçue par le TCR à l'intérieur du lymphocyte, permettant le déclenchement d'une cascade de signalisation conduisant à l'activation du lymphocyte T (figure 5.22b). Cette transmission se fait par l'intermédiaire des motifs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) qui se situent sur les parties cytoplasmiques des chaînes CD3 (figure 5.22a).

C'est la mise en contact du TCR et de son ligand, ensemble de peptides antigéniques liés à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimée par une cellule présentatrice d'antigènes (CPA), déclenchant cette cascade de signalisation, qui doit aboutir enfin à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes T. De nombreuses autres molécules sont nécessaires à la stabilisation de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide + CMH ou à l'amplification des événements de transmission du signal.

L'activation par le TCR implique l'activation séquentielle de multiples protéines tyrosines kinases (PTK). L'événement initial est la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM des chaînes ζ et des chaînes γ , δ et ϵ du complexe CD3, par la kinase p56lck. La phosphorylation des motifs ITAM permet le recrutement par le TCR de la kinase ZAP-70. Ceci enclenche la phosphorylation de ZAP-70 par Lck. Une fois

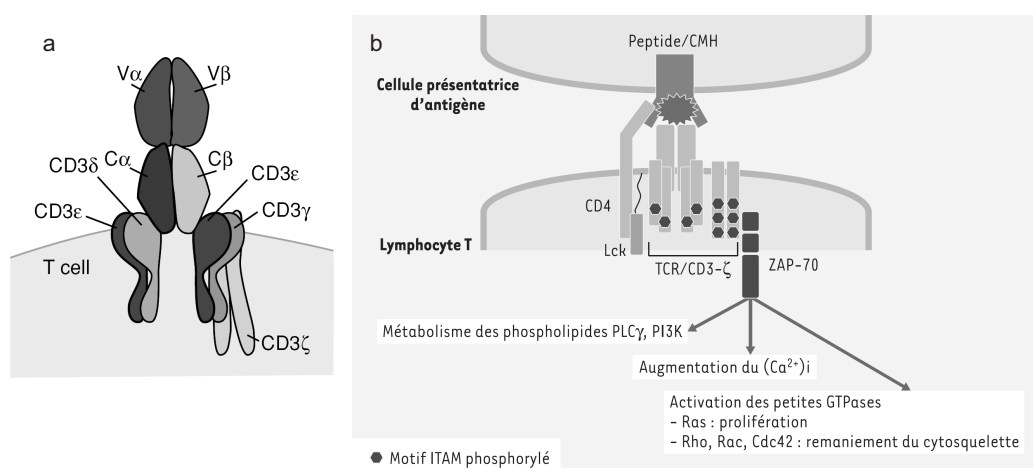


FIG. 5.22 – Structure et rôle du complexe TCR/CD3- ζ .

a) Le TCR est un hétérodimère formé d'une chaîne α et d'une chaîne β . Chacune de ces deux chaînes est constituée de deux domaines : un domaine variable (V_α ou V_β) et un domaine constant (C_α ou C_β). Il est associé à un complexe CD3 formé de deux chaînes ϵ , d'une chaîne δ , d'une chaîne γ et d'un dimère ζ . D'après [Gascoigne 01]. b) La reconnaissance par le TCR (T cell receptor) de son ligand, sous la forme d'un complexe peptide + CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), présenté par la cellule présentatrice d'antigène induit la phosphorylation des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) du complexe TCR/CD3- ζ . Cela permet l'association de la tyrosine kinase Zap-70 au TCR. Zap-70, une tyrosine kinase activée par phosphorylation, modifie l'activité de plusieurs enzymes en les phosphorylant, entraînant ainsi le déclenchement de plusieurs voies de signalisation indispensables à la réponse immune T. D'après [Hivroz 04].

activées, les PTK coopèrent pour phosphoryler et recruter des protagonistes de la signalisation, qui contribueront à déclencher la cascade des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinase*), l'activation des PI3 kinases (enzymes qui phosphorylent le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate ($PI_{4,5}P_2$) en $PI_{3,4,5}P_3$) et les flux calciques. Le recrutement de ZAP-70 au complexe TCR activé est une étape clé dans la cascade de signalisation qui mène à la prolifération des lymphocytes T.

Une étude a montré que les ITAM sont impliqués dans la réorganisation du cytosquelette après engagement du TCR [Lowin-Kropf 98]. De plus, il semblerait que les radeaux lipidiques jouent un rôle important dans l'établissement des cascades de signalisation [Xavier 98]. La rapidité de l'enchaînement des différentes étapes de ces cascades pourrait par exemple être expliquée par la colocalisation des différentes molécules intervenant dans le mécanisme au sein d'un même radeau lipidique.

5.3.1 Mesures de lois de diffusion FCS en l'absence d'activation

Cellules 3A9

Les cellules 3A9 sont des hybridomes T (cellules issues de l'hybridation d'un lymphocyte T (CD4) et d'une cellule cancéreuse). Elles sont donc issues d'une lignée

stable.

Elles ont été largement étudiées par l'équipe d'H.-T. He. Il est notamment possible de mimer l'activation de la cellule par le complexe peptide-MHC à l'aide d'un anticorps (clone 2C11) dirigé contre la sous-unité CD3- ϵ du TCR.

Nous étudions la loi de diffusion FCS de la chaîne ζ du complexe CD3 grâce à la protéine de fusion ζ -YFP. L'étude du complexe CD3 est réalisée à travers la chaîne ζ , car c'est le facteur limitant de la formation d'un complexe à la membrane plasmique : en l'absence de cette chaîne ζ , le complexe CD3 ne va pas à la membrane. D'autre part, ζ est la chaîne peptidique constitutive de CD3 ayant la plus grande partie intracellulaire : il est donc possible de réaliser une construction dans laquelle le fluorophore YFP est plus éloigné de la membrane afin de réduire son influence sur les propriétés de la chaîne.

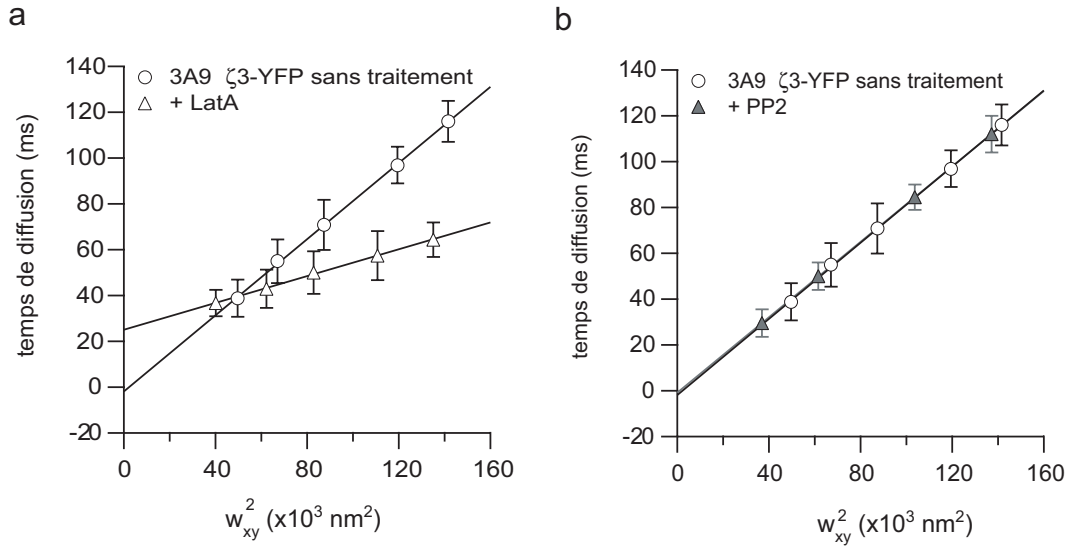


FIG. 5.23 – Lois de diffusion de ζ -YFP dans les cellules 3A9 sans activation. a) Traitement Latrunculine A ($1 \mu\text{M}$). b) Addition de PP2 (inhibiteur de la phosphorylation, $10 \mu\text{M}$).

ζ -YFP a une loi de diffusion FCS dans les cellules 3A9 sans activation qui est analogue à une diffusion libre : il s'agit d'une droite passant par l'origine. Néanmoins, il ne s'agit pas d'une diffusion libre, comme le montre la loi de diffusion FCS mesurée après désorganisation du cytosquelette d'actine par un traitement à la Latrunculine A ($1 \mu\text{M}$ pendant 30 min). En effet, lorsque le confinement par le réseau d'actine est relâché, la loi de diffusion FCS devient une droite avec une ordonnée à l'origine positive (figure 5.23a). La loi de diffusion FCS mesurée pour les cellules 3A9 sans traitement ni activation pourrait donc être le résultat de la superposition de deux mécanismes de confinement : l'un par le réseau d'actine, l'autre par des microdomaines isolés.

Un traitement pourrait perturber l'éventuelle organisation en radeaux lipidiques de la membrane des 3A9 : la déplétion métabolique par l'acide zaragozique et la myriocine.

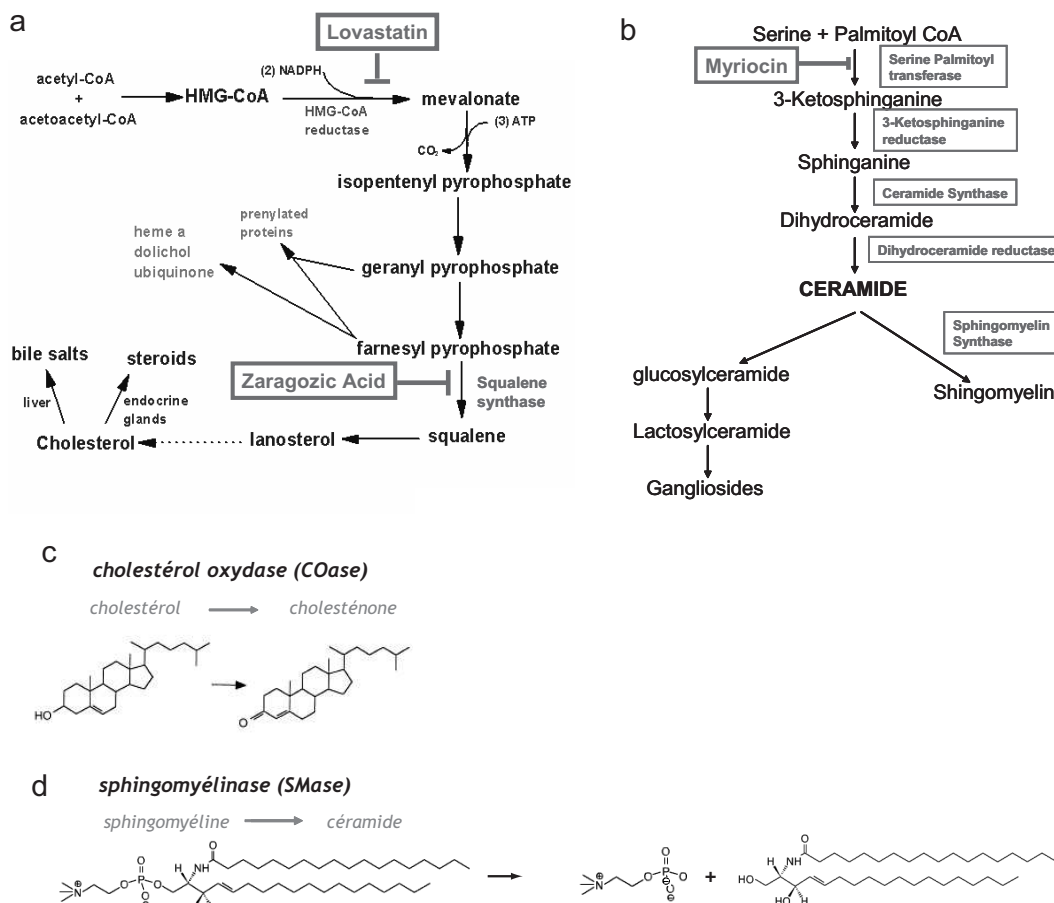


FIG. 5.24 – Action des différentes drogues agissant sur la composition lipidique de la membrane.

a) L'acide zaragozique inhibe la synthèse du cholestérol. Il agit néanmoins après l'étape de la synthèse du farnésyl pyrophosphate, nécessaire à la prénylation de protéines. b) La myriocine inhibe la synthèse de la sphingomyéline, en bloquant une des premières étapes de cette synthèse. c) La cholestérol oxydase oxyde la cholestérol en une cétone, la cholesténone. d) La sphingomyélinase transforme la sphingomyéline en céramide.

L'acide zaragozique est un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol : en agissant sur l'enzyme *squalène synthétase* nécessaire à la synthèse du squalène, étape indispensable à la synthèse du cholestérol.

La myriocine est un inhibiteur de la biosynthèse des sphingomyélines : en agissant sur l'enzyme *sérine palmitoyltransférase* nécessaire à la synthèse de la 3-Oxosphinganine, étape indispensable à la synthèse de la sphingomyéline.

L'usage des deux drogues acide zaragozique et myriocine constitue ce que l'on appellera la déplétion métabolique.

L'utilisation de la déplétion métabolique serait idéale afin de vérifier si la loi de diffusion FCS en présence de Latrunculine A peut être expliquée par la présence de radeaux lipidiques. Malheureusement, les cellules 3A9 ne supportent pas un tel double traitement.

Nous avons donc essayé de travailler avec un autre type cellulaire : Jurkat.

Cellules Jurkat

Les cellules Jurkat proviennent d'une lignée cellulaire dérivée de cellules T leucémiques humaines. Nous avons à disposition la protéine de fusion ζ -GFP, qui nous permettra de mesurer la loi de diffusion FCS comme cela a été réalisé dans les cellules 3A9. De plus, il est également possible d'activer ces cellules Jurkat grâce à un anticorps anti-CD3- ϵ humain.

La loi de diffusion FCS mesurée pour ζ -GFP est une droite d'ordonnée à l'origine fortement positive ($23,3 \pm 2,5$ ms). La désorganisation du cytosquelette par un traitement à la Latrunculine A modifie cette loi de diffusion en augmentant encore cette ordonnée à l'origine (figure 5.25a) : ceci montre que le réseau d'actine est partiellement responsable du confinement de ζ -GFP. D'autre part, un autre mécanisme doit expliquer la droite obtenue après traitement à la Latrunculine A : il se pourrait que un confinement transitoire dans des domaines isolés explique un tel comportement. Afin de vérifier cette hypothèse, une déplétion métabolique (double traitement par l'acide zaragozique et la myriocine) est opérée sur les cellules Jurkat. Ce traitement modifie encore la loi de diffusion : en relâchant le confinement par les radeaux lipidiques, il fait apparaître une loi de diffusion FCS affine avec une ordonnée à l'origine négative, caractéristique d'une diffusion confinée dans un réseau (figure 5.25a).

Il semblerait donc que la diffusion libre de ζ -GFP est donc à la fois empêchée par la présence du réseau d'actine et par celle des radeaux lipidiques. Une étape supplémentaire permettant la vérification de ce résultat serait de réaliser un triple traitement (double déplétion métabolique et traitement à la Latrunculine A). Il apparaît que les cellules ne résistent pas à un tel traitement...

Contrairement aux cellules 3A9, qui sont constitutivement non activées, les cellules Jurkat sont constitutivement activées. Ceci signifie que, même en l'absence de son ligand, les ITAMs sont fortement phosphorylés. Cela été étudié par l'équipe d'H.-T. He par mesure du profil de phosphorylation de ces cellules : cette méthode permet de révéler toutes les protéines contenant des tyrosines phosphorylées.

Tout comme les cellules 3A9, les cellules Jurkat ont en fait un niveau basal d'activation relativement élevé et qui se caractérise par une phosphorylation non nulle des motifs ITAMS en absence d'un ligand spécifique. Cela a été étudié entre autre par l'équipe d'H.-T. He en analysant à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement les résidus tyrosine phosphorylés, le profil et le degré de phosphorylation des protéines présentes dans les cellules Jurkat.

La loi de diffusion FCS de ζ -GFP pourrait être modifiée par cet état activé. Afin de le vérifier, nous avons utilisé des inhibiteurs de la phosphorylation permettant

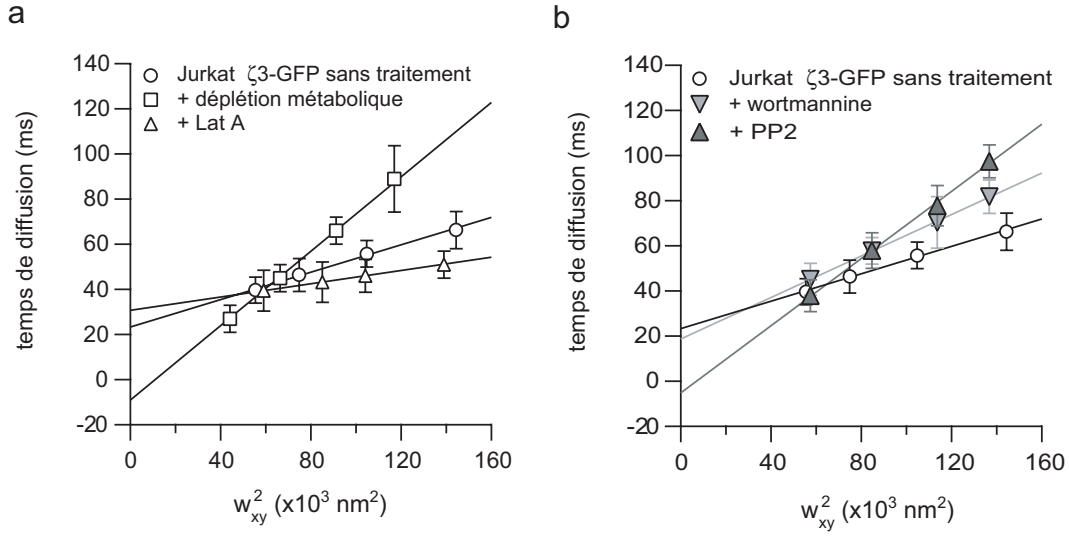


FIG. 5.25 – Lois de diffusion de ζ -GFP dans les cellules Jurkat sans activation. a) Traitements Latrunculine A ($1\mu\text{M}$) et déplétion métabolique (acide zaragozique et myriocine). b) Addition de PP2 ($10\mu\text{M}$) ou wortmannine.

de bloquer cette activation aspécifique des cellules Jurkat à l'aide d'inhibiteurs de l'activité kinase : la PP2⁴⁵ (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(tbutyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) sélectif des protéines tyrosines kinases de la famille Src) et la wortmannine sélective de la phosphatidyl-inositol 3-kinase.

Chacune de ces deux drogues modifie la loi de diffusion FCS de ζ -GFP, en diminuant l'ordonnée à l'origine (figure 5.25b). On peut supposer que l'inhibition de la phosphorylation diminue le confinement de la protéine de fusion dans les radeaux lipidiques, soit en diminuant le temps moyen de confinement dans un domaine, soit en diminuant la partition dans les domaines.

La même expérience menée sur les cellules 3A9 ne montre pas d'effet de l'addition de PP2 sur la loi de diffusion FCS de la protéine ζ -GFP (figure 5.23b). On peut noter par ailleurs que le comportement de diffusion de ζ -GFP dans les cellules Jurkat après addition de PP2 est très semblable à celui de cette même molécule dans les cellules 3A9 n'ayant subi aucun traitement. Il est possible que ces différences entre les lignées 3A9 et Jurkat reflètent plus une différence d'organisation de la membrane plasmique qui découlerait d'une différence de compositions lipidiques. Des expériences complémentaires devront être réalisées pour consolider ces observations.

⁴PP2 est également susceptible d'inhiber la phosphorylation des tyrosines stimulées par anti-CD3 mais n'affecte pas de façon significative l'activité de la kinase EGFR, de JAK2 ou de ZAP-70.

⁵PP2 est introduit dans le milieu de mesure à la concentration de $10 \mu\text{M}$, 10 min avant le début de la manipulation.

5.3.2 Mesures de lois de diffusion FCS lors de l'activation

Afin de suivre de façon quantitative la dynamique d'organisation de la membrane lors de l'activation d'une cellule, nous réalisons des mesures FCS à différentes étapes après introduction de l'anticorps activant le TCR dans le milieu de mesure.

Nous avons choisi de faire des mesures en continu sur une même cellule pendant une durée de 10 min. Six *runs* de 12 s sont réalisés par période de 1 min, permettant de tracer une ACF pour chacune de ces périodes. En faisant la même expérience sur huit cellules différentes (et donc huit expériences d'activation), il est alors possible de calculer un temps moyen de diffusion pour chaque période de 1 min. Le même travail peut également être conduit pour différents waists w_{xy} .

Après avoir placé la membrane plasmique d'une cellule dans le volume confocal, on introduit l'anticorps directement dans le milieu d'observation des cellules. Le temps $t = 0$ est choisi 30 s après l'introduction de l'anticorps dans le milieu. Ceci ne correspond pas exactement à l'instant de mise en contact de la cellule avec l'anticorps, puisqu'il faut préalablement que celui-ci l'atteigne. Le transport de l'anticorps ne se fait pas uniquement par diffusion (très lente !) mais aussi par convection (notamment lors de l'injection dans le milieu), ce qui diminue de façon conséquente le temps de mise en contact de l'anticorps et de la cellule.

Cellules 3A9

Les expériences d'activation ont été réalisées en utilisant l'anticorps anti-CD3 (clone 2C11, $4\mu\text{g/mL}$). Nous avons pu montrer que les lois de diffusion varient largement lors de l'activation (figure 5.26). L'effet maximal est mesuré entre la deuxième et la troisième minute après mise en contact de l'anticorps et de la cellule. À cette date, la loi de diffusion devient une droite horizontale ($t_d = 70 \pm 3$ ms). On observe le basculement progressif de la droite représentative de la loi de diffusion sans traitement ni activation à cette droite horizontale entre le temps $t = 0$ et le temps $t \in [3; 4]$ min, puis un retour progressif au comportement initial de $t \in [3; 4]$ min à $t \in [9; 10]$ min.

Afin d'identifier les mécanismes responsables de ce changement de loi de diffusion, les mêmes mesures de lois de diffusion FCS lors de l'activation sont réalisées sur des cellules préalablement traitées.

Lorsque l'on procède à la désorganisation du cytosquelette par la Latrunculine A, on observe le même changement de comportement réversible, avec un effet maximal à $t \in [3; 4]$ min. La loi de diffusion mesurée au pic d'activation est identique à celle obtenue en l'absence de traitement.

Si on active les cellules en présence de la drogue PP2 inhibant la phosphorylation, la loi de diffusion obtenue au pic d'activation reste très proche de celle obtenue en l'absence d'activation : l'amplitude du basculement réversible observé jusqu'ici est plus faible. Ce comportement correspondrait bien à un processus d'activation moins prononcé en présence de l'inhibiteur de phosphorylation.

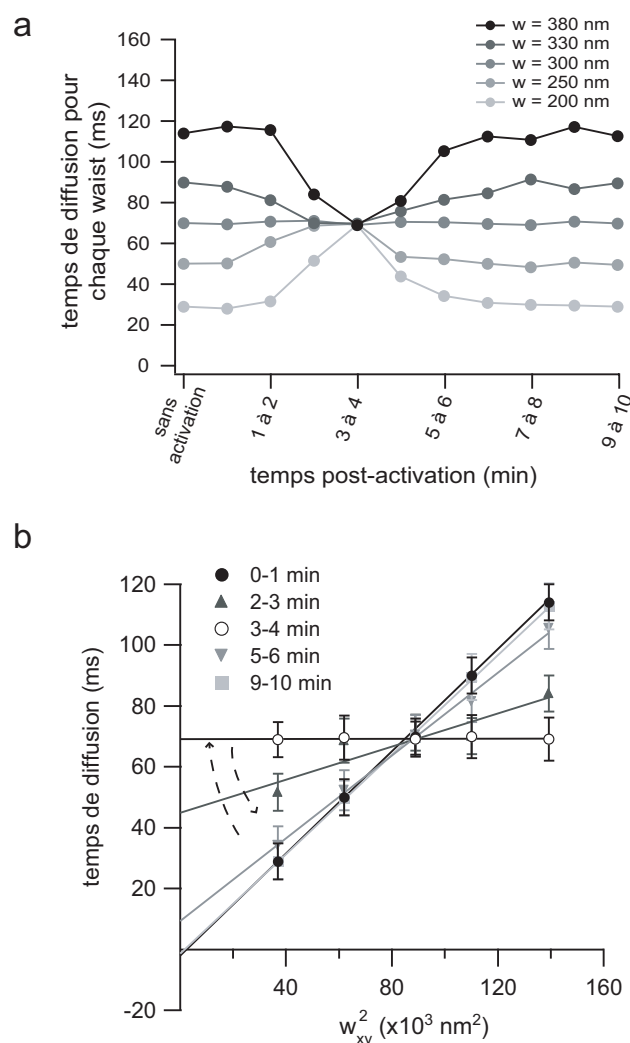


FIG. 5.26 – Lois de diffusion de ζ -YFP dans les cellules 3A9 lors de l'activation. a) Comportement au cours du temps des temps de diffusion pour chaque taille de volume confocal. Les barres d'erreurs ont été omises pour plus de lisibilité. b) Lois de diffusion résultantes représentées pour différents intervalles temporels.

La réorganisation membranaire à laquelle est sensible la technique de FCS semble connaître son apogée environ 3 minutes après mise en contact de l'anticorps avec la cellule. Les études biochimiques menées par l'équipe d'H.-T. He ont montré que la phosphorylation a lieu environ 2 min après activation ; les flux calciques peuvent également être détectés environ 2 min après activation. Toutes ces données temporelles semblent donc cohérentes.

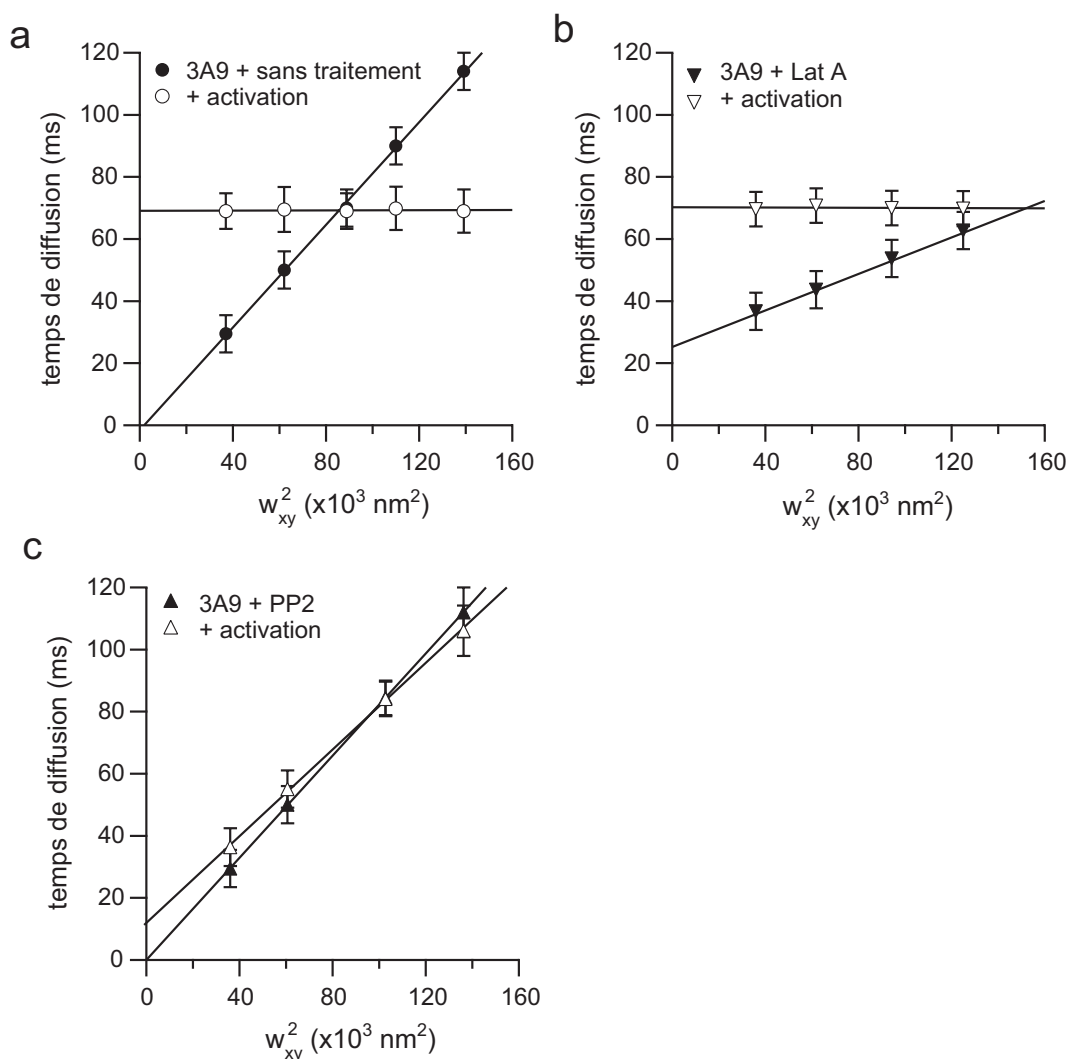


FIG. 5.27 – Lois de diffusion de ζ -YFP dans les cellules 3A9 en l'absence d'activation et 3 min après activation, après différents traitements.

a) Sans traitement. b) + Latrunculine A ($1\mu\text{M}$). c) + PP2 ($10\mu\text{M}$)

Cellules Jurkat

Afin de savoir si les radeaux lipidiques jouent un rôle dans l'activation, nous reprenons les expériences précédentes, mais cette fois-ci sur les cellules Jurkat, qui supportent les expériences de désorganisation des radeaux lipidiques par déplétion métabolique. L'anticorps utilisé est cette fois-ci un anti-CD3- ϵ humain ($4\mu\text{g/mL}$).

Les trois expériences d'activation respectivement sans traitement, avec désorganisation du cytosquelette par traitement à la Latrunculine A et avec addition de la drogue (PP2), conduisent aux mêmes résultats que ceux obtenus pour les cellules 3A9 :

- la droite correspondant à la loi de diffusion FCS de ζ -GFP est modifiée lors de

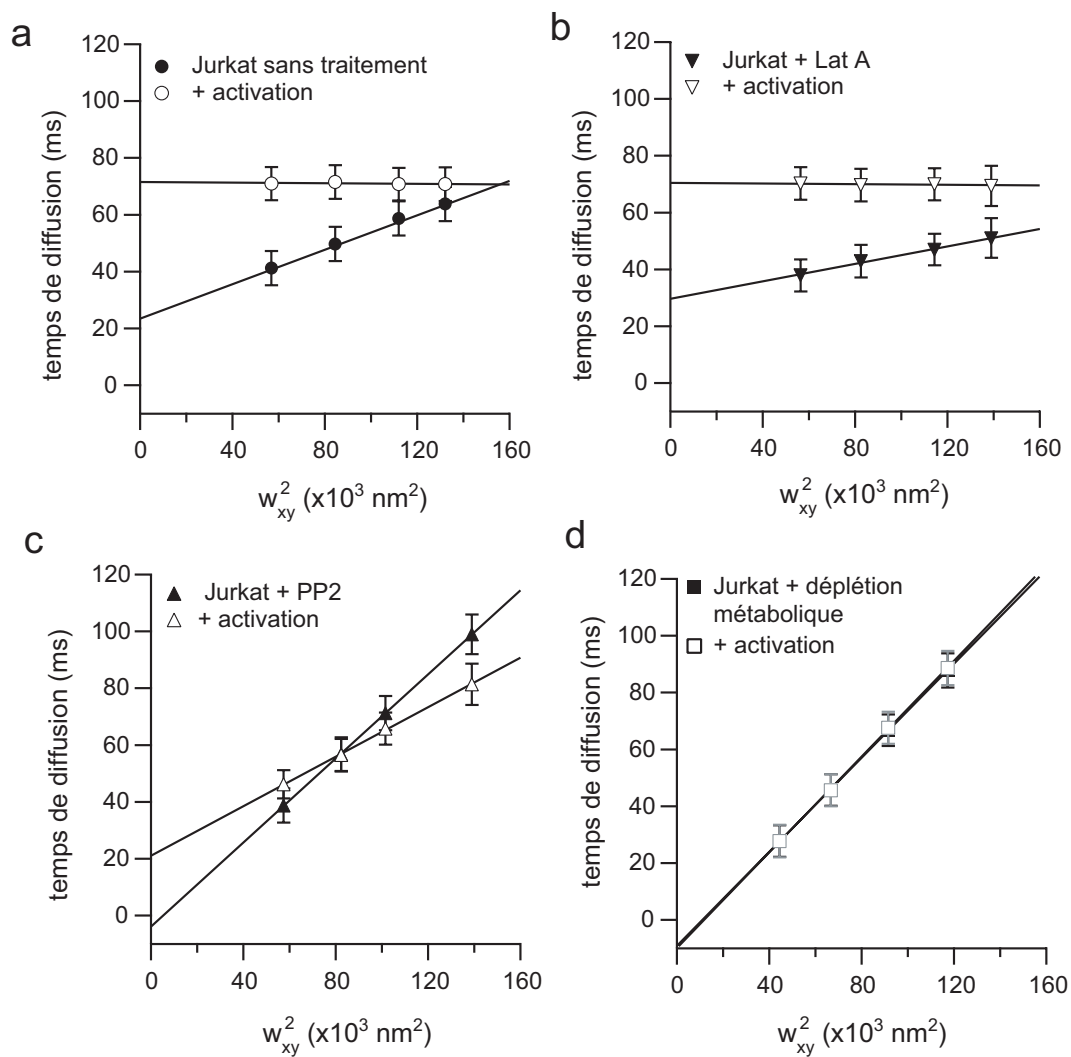


FIG. 5.28 – Lois de diffusion de ζ -GFP dans les cellules Jurkat en l'absence d'activation et 3 min après activation, après différents traitements.

a) Sans traitement. b) + Latrunculine A ($1\mu\text{M}$). c) + PP2 ($10\mu\text{M}$). d) + déplétion métabolique

l'activation, en basculant jusqu'à devenir horizontale environ 3 min après mise en contact de la cellule et de l'anticorps. L'équation de la droite à $t \in [3; 4]$ min est par ailleurs identique à celle obtenue avec les cellules 3A9.

- le traitement par la Latrunculine A n'a pas d'effet sur cette modification réversible.
- l'addition de PP2 réduit de façon importante le basculement de la droite représentative de la loi de diffusion FCS.

Enfin, les cellules Jurkat permettent de réaliser l'étude des effets sur l'organisation membranaire de l'activation après déplétion métabolique. Il apparaît qu'après un double traitement par l'acide zaragozique et la myriocine, la loi de diffusion FCS n'est plus modifiée au cours de l'activation : dans ce cas, la structuration de la membrane ne subit pas de réorganisation suite à l'activation. Il semblerait donc que la présence de cholestérol et de sphingomyéline soit absolument nécessaire à la réorganisation membranaire en réponse à un événement de signalisation.

Le confinement total : une piste pour une interprétation de ces résultats expérimentaux

Nous présentons ici un modèle sommaire permettant d'interpréter la droite horizontale obtenue lors du pic d'activation.

Il serait envisageable de supposer que les radeaux lipidiques se comportent comme des structures confinant transitoirement les molécules en l'absence d'activation, alors que ce confinement devient quasiment total en présence d'activation ou, tout du moins, le temps de diffusion à l'extérieur des radeaux lipidiques est négligeable devant le temps de confinement à l'intérieur. Un tel comportement pourrait effectivement expliquer le basculement de la droite représentative de la loi de diffusion FCS 5.29. Néanmoins, le photoblanchiment devrait provoquer l'extinction de la fluorescence des molécules confinées dans un domaine fixe plus petit entièrement inclus dans le volume d'excitation. Calculons la surface possible d'un tel domaine : puisque la droite horizontale est obtenue pour un paramètre de confinement $X_c^2 > 1$ et que le waist de travail le plus petit est de 200 nm, le rayon du domaine est nécessairement plus petit que 200 nm.

Ces structures de confinement de taille plus importante pourraient être le résultat de la fusion des radeaux lipidiques préexistant à l'événement de signalisation (figure 5.30). Un confinement total dans une structure plus grande pourrait expliquer que certaines techniques ne permettent de mettre en évidence la présence de radeaux lipidiques que lors d'un événement de signalisation.

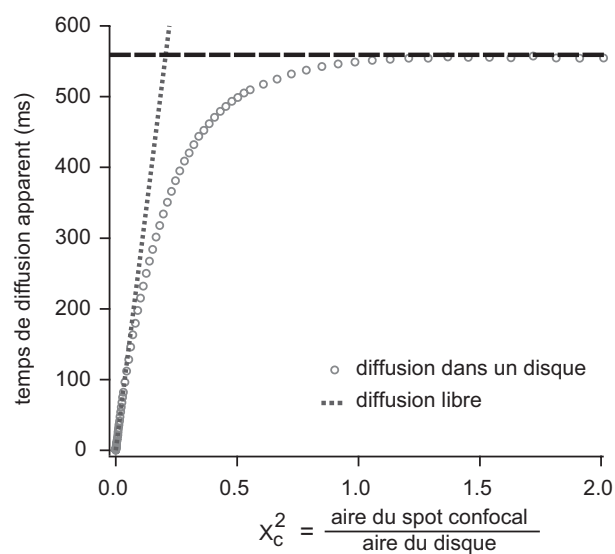


FIG. 5.29 – Loi de diffusion obtenue dans le cas du modèle de confinement total. Temps de diffusion apparent mesuré pour différentes tailles de volume confocal, la taille du domaine restant fixée. Le temps de saturation mesuré pour les grands waists est proportionnel à la taille du domaine.

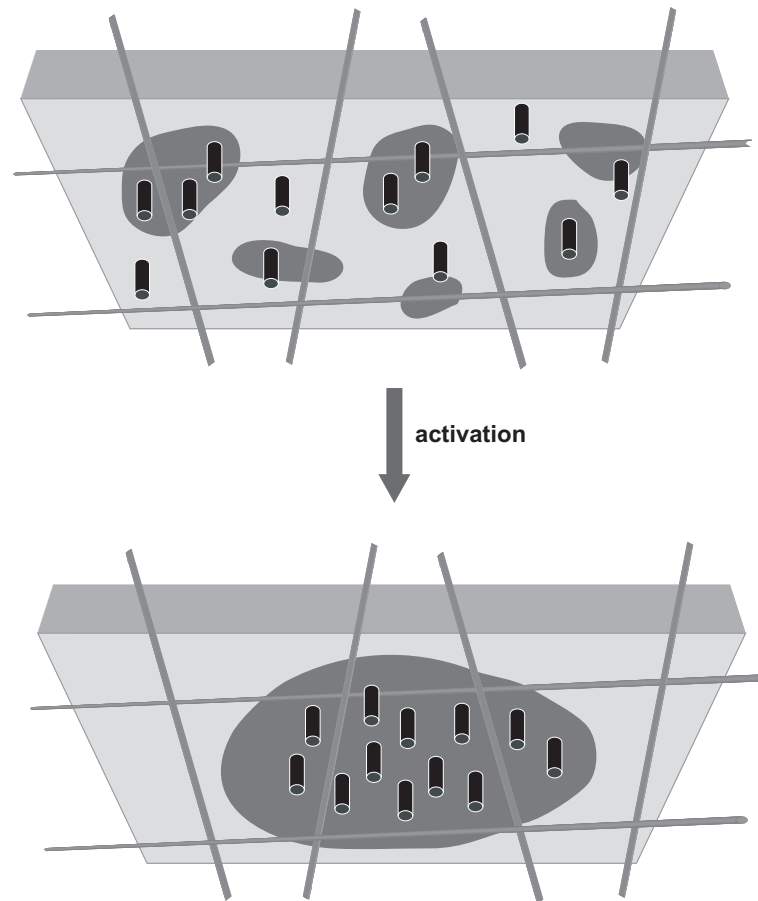


FIG. 5.30 – Proposition de modèle de réorganisation de la membrane lors de l'activation d'une cellule T.

Les radeaux lipidiques existent lorsque la cellule est à l'état de repos : les molécules membranaires sont susceptibles d'être confinées transitoirement dans ces structures. Lors de l'activation, il y a fusion des radeaux lipidiques, donnant naissance à une structure plus large et confinant totalement les molécules.

Conclusion

Les résultats obtenus

La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une technique de plus en plus présente au sein des laboratoires de recherche en biologie. Les utilisateurs ne sont malheureusement pas toujours bien avertis des limitations de cette technique. Comme c'est le cas de toutes les techniques de mesure, des conclusions fausses peuvent être tirées à partir d'une mauvaise utilisation de la FCS.

Alors que nombre de techniques de microscopie optique fournissent de belles images colorées très parlantes, la FCS ne donne accès qu'à une courbe parfois difficilement exploitable : la fonction d'autocorrélation (ACF). Pourtant, les biologistes ne se laissent plus rebuter par l'âpreté des résultats fournis par cet outil bientôt quarantenaire : la FCS possède des atouts remarquables, permettant notamment de réaliser des mesures à des échelles spatio-temporelles très intéressantes, tout en conservant une très bonne statistique.

Nous avons d'abord montré les limites de l'utilisation de la FCS à une seule taille de volume confocal dans la caractérisation d'un comportement de diffusion. L'interprétation de la forme de l'ACF et la recherche de l'ajustement idéal sont souvent des points d'achoppement dans les mesures FCS, notamment lorsque la diffusion est empêchée par des obstacles ou des mécanismes spécifiques, comme c'est le cas des molécules de la membrane plasmique des cellules vivantes. Afin de contrer cette difficulté, nous avons décidé ici de nous contenter de tirer une seule information de cette courbe expérimentale, en évaluant un temps caractéristique de fluctuation de fluorescence due à la diffusion des fluorophores à travers le volume confocal.

La variation de la taille du volume confocal permet alors de tracer la *loi de diffusion FCS*, c'est-à-dire l'évolution du temps caractéristique mesuré par FCS en fonction de la surface de membrane éclairée. Cette loi de diffusion est alors obtenue sans avoir eu besoin de faire des hypothèses quant au mode de diffusion ; seule son interprétation nécessitera de faire des allers-retours entre l'expérience et les modèles...

La membrane plasmique n'est actuellement pas décrite comme un ensemble homogène. La diffusion des molécules membranaires est sans aucun doute ralentie par les hétérogénéités ou les obstacles de la membrane. Deux modèles de structuration de la membrane sont souvent proposés : le réseau de cytosquelette d'actine et les radeaux

lipidiques. Nous avons montré que notre méthode de mesure de lois de diffusion FCS est capable de distinguer entre ces deux causes de confinement moléculaire, voire de mettre en évidence la coexistence de ces deux mécanismes.

Il est généralement admis que les radeaux lipidiques jouent un rôle fonctionnel important en confinant les molécules impliquées dans les cascades de signalisation. Notre méthode a permis de quantifier un temps caractéristique : l'indice de confinement.

Une étude plus quantitative a également été menée, qui a permis de montrer que les molécules associées aux radeaux lipidiques subissent des confinements de durée variée, de l'ordre de quelques ms jusqu'à plusieurs dizaines de ms. Les molécules possédant une partie intracytoplasmique sont également confinées par le réseau d'actine du cytosquelette. Le temps de confinement moyen dans une maille du cytosquelette dépend directement de la taille du fragment intracytoplasmique et est de l'ordre de 1 à 50 ms. Ces durées sont tout à fait compatibles avec la réalisation de processus biologiques.

Enfin, quelques éléments de réflexion ont été proposés de façon à étudier la dynamique d'organisation de la membrane lors de l'activation cellulaire. Nous avons pu mettre en évidence un changement important des lois de diffusion FCS lié à la transduction d'un signal extérieur.

Avenir de la méthode

Nous avons développé une méthodologie facile à mettre en œuvre dans les différents laboratoires possédant un montage de FCS, qui apporte une amélioration très nette par rapport à l'utilisation brute d'un temps de diffusion mesuré par autocorrélation. Il serait donc tout à fait imaginable qu'elle soit rapidement mise en pratique par d'autres laboratoires. L'équipe d'Engelborghs a d'ailleurs montré récemment que notre méthode peut être utilisée avec le microscope commercial *Confocor* permettant de faire des mesures FCS [Humpolícková 06].

L'utilisation de nanotrous permettant d'étudier les lois de diffusion à petites tailles de volumes confocaux, permettra également d'accroître la valeur ajoutée de cette technique.

Un inconvénient non négligeable de la mesure FCS reste la nécessité d'utiliser des analogues fluorescents ou des protéines de fusion. Non seulement ces fluorophores subissent du photoblanchiment, mais il est aussi concevable que la présence du fluorophore modifie la dynamique de la molécule à laquelle il est attaché. Afin de pallier cette difficulté, il serait possible d'utiliser la technique de CARS (*Coherent Antistokes Raman Scattering*) : la spectroscopie Raman ne nécessite en effet pas de marquage spécifique car elle utilise les fréquences de vibration intrinsèques des liaisons chimiques. Son adaptation en CARS-CS (Spectroscopie de Corrélation de signal CARS)

permettrait d'éviter l'opération délicate, voire impossible, d'introduction d'un fluorophore fonctionnalisé à un emplacement cellulaire spécifique. D'où l'intérêt du CARS et du CARS-CS comme outils d'étude de l'organisation de la membrane biologique.

De la collaboration entre biologistes et physicien

Avec la microscopie de fluorescence sont également entrées dans les laboratoires de biologie nombre de techniques de traitement de l'information : la FCS, mais aussi le FRAP, le FRET, le FLIM, le FLIP, etc... Bien sûr, ces outils possèdent des limitations expérimentales qu'il est vraiment indispensable de prendre en compte ; mais ils sont également souvent livrés en association avec un logiciel de traitement de l'information brute. Or le traitement de l'information nécessite par essence de faire des hypothèses. L'utilisateur doit donc nécessairement vérifier que les hypothèses faites sont compatibles avec l'expérience qu'il souhaite mener !

Première doctorante de l'équipe Mosaïc travaillant vraiment à l'interface entre le physique et la biologie, il m'est parfois arrivé d'"essayer les plâtres"⁶ de cette collaboration naissante. Une question persistante fut notamment de savoir où se trouve la place de chacun : le physicien doit-il faire des expériences de biochimie ou se contenter de la culture cellulaire, le biologiste ne doit-il pas participer aux simulations, afin de mieux en comprendre les résultats ?

Mais surtout, la présence du couple biologiste-physicien ne serait-elle pas nécessaire lors des expériences de FCS ? Car si le physicien est plus à l'aise avec le réglage du montage, la présence du biologiste permettrait de ne pas réaliser des mesures sur cellules mourantes... Ma collaboration avec Omar Hawchar, qui a permis de faire les mesures d'activation sur les cellules 3A9 et Jurkat, a été exemplaire sur ce point. Ce travail long et ingrat a été rendu beaucoup plus aisé par une optimisation de la répartition des tâches : Omar s'occupant entièrement de la culture cellulaire, du marquage et des traitements biologiques — mais également du choix des cellules sur lesquelles ont été réalisées les mesures —, alors que je passais de longues (voire très longues !) journées dans le noir pour prendre les mesures. Sans pour autant nous transformer en OS, ce travail en binôme a été réellement fructueux.

Je pense réellement que la rationalisation du partage des tâches entre biologistes et physiciens pourrait garantir une longue vie à ce partenariat passionnant !

⁶Littré l'indique dans son dictionnaire : essayer les plâtres, c'est "essayer des désagréments inévitables dans une fonction nouvelle" !

Annexe A

Cellules COS-7 :

protocoles expérimentaux

A.1 Passage des cellules COS-7

Le milieu utilisé pour cultiver nos cellules est un mélange constitué de :

- 450 mL de DMEM (*Dulbecco's Mod Eagle Medium*) contenant 450 mg/L de glucose
- 50 mL de FCS (*Foetal Calf Serum*)
- 5 mL de pyruvate de sodium
- 2 mL d'antibiotique (P/S)

Pour l'entretien de la lignée, le passage est réalisé au 1/5 ou 1/10. Toutes les étapes décrites ci-dessous doivent être réalisées de façon stérile.

1. Aspirer le milieu de culture avec micropipette. Les cellules COS-7 sont adhérentes et restent donc au fond du puits.
2. Rincer deux fois avec du PBS (3 mL par puits). Le jet de PBS doit être dirigé vers le côté du puits afin de ne pas décoller les cellules.
3. Ajouter 1 mL de Trypsin-EDTA par puits.
4. Incuber à 37°C pendant 2 min (digestion ménagée des protéines responsables de l'adhésion).
5. Tapoter la plaque pour finir le décollement.
6. Ajouter 3 mL de milieu complet (DMEM+ 10% FCS) par puits afin de bloquer l'effet de la Trypsin-EDTA.
7. Transférer dans un tube de 15 mL et compléter à 10 mL avec du milieu complet.
8. Centrifuger pendant 5 min à 1200 tr/min.
9. Éliminer le surnageant.
10. Ajouter 6 mL de milieu complet sur le culot et resuspendre.

On obtient ainsi 6 mL de solution par tube. On procède alors à un passage au 1/5 ou 1/10 (i.e. on remplit un puits avec 1/5 de solution contenant des cellules et 4/5 de milieu de culture DMEM+10% FCS).

A.2 Marquage fluorescent de la membrane plasmique des cellules COS-7

A.2.1 Incorporation des analogues lipidiques fluorescents dans la membrane plasmique

Exemple : préparation de FL-PC dans BSA

Les solutions suivantes peuvent être conservées sur une longue durée :

- Bodipy-PC (noté FL-PC) est conservé à une concentration de 0,1 mM dans de l'éthanol (noté EtOH).
- HBSS
- Hepes 1 M
- 3,4 mg de FAF-BSA (*Fatty acid-free Bovine Serum Albumine*) dans 1 mL dans HBSS+Hepes 10 mM (solution de pH=7,2).

À partir de ces solutions, on peut préparer les solutions diluées suivantes :

- solution de HBSS+Hepes 10 mM
- dilution par 10 de la solution stock de FAF-BSA dans HBSS+Hepes pour obtenir la concentration de travail

On réalise d'abord une solution de FL-PC dans BSA à une concentration de 0,5 μ M :

1. Dans un *ependorf*, verser 1 mL de BSA dans HBSS+Hepes.
2. Ajouter 5 μ L de FL-PC dans EtOH dans l'*ependorf*.
3. Refermer rapidement le tube *ependorf* et vortexer.
4. Conserver FL-PC dans l'*ependorf* à -20°C, dans un film aluminium.

Marquage des cellules par les analogues lipidiques fluorescents : exemple de FL-PC

Le marquage est généralement réalisé à une concentration plus faible que 0,5 μ M. Selon la nature des analogues lipidiques, la concentration de travail se situe entre 0,01 μ M et 0,1 μ M. Il est réalisé directement dans les cuves *nunc*.

Le protocole de marquage des cellules est le suivant :

1. Laver une fois dans HBSS+Hepes (sans BSA).
2. Incuber dans 200 μ L de FL-PC dans BSA à 4°C pendant 30 min.
3. Laver deux fois dans HBSS+Hepes (sans BSA).
4. Incuber pendant au moins 2 h à 37°C.

D'autre part, le marquage des cellules est réalisé de préférence la veille au soir (12 h d'incubation), mais les expériences ont également été menées après seulement 2 h d'incubation. Aucune différence n'a été constatée entre les résultats obtenus pour les différentes durées d'incubation. Seule l'insertion de FL-PE dans la membrane a nécessité un protocole différent. FL-PE subit un flip-flop très rapide et se trouve essentiellement dans le feuillet interne. Une période d'incubation trop longue provoque une intégration trop importante de ce lipide dans les membranes intranucléaires. Afin d'éviter ce phénomène, l'incubation des cellules dans FL-PE dans BSA s'effectue à température ambiante, pendant 15 min. Après les deux rinçages en HBSS+Hepes, l'observation se fait immédiatement.

A.2.2 Incorporation des protéines fusionnées à la GFP dans la membrane plasmique

Préparation du plasmide GFP-GPI

Protocole de transfection de GFP-GPI dans les cellules COS-7

Le plasmide est conservé à -20°C , dans un tube *ependorf* contenant environ $5\text{ }\mu\text{L}$ de produit, à une concentration en ADN de $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La veille des manipulations, à 9 h, les cellules sont passées dans les cuves *nunc*. Vers 17 h, on procède à la transfection (il est préférable que les cellules soient déjà bien adhérentes).

1. Diluer $1\text{ }\mu\text{L}$ d'ADN stérile (à $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dans $100\text{ }\mu\text{L}$ de NaCl stérile (à 150 mM). Parallèlement, diluer $10\text{ }\mu\text{L}$ d'Exgen-500 stérile dans $90\text{ }\mu\text{L}$ de NaCl stérile (à 150 mM).
2. Changer le milieu de culture des cellules par du milieu frais ($400\text{ }\mu\text{L}$ par puits).
3. Mélanger le contenu des deux tubes contenant l'ADN et l'Exgen. Tapoter. Attendre 10 à 15 min à température ambiante.
4. Disperser environ 15 à 20 μL de cette solution dans chaque puits, selon le niveau d'expression souhaité. On prévoira d'ajouter un peu moins de plasmide lorsque l'on souhaite travailler sur certains puits le surlendemain.

Le jour des manipulations, on remplace le milieu de culture DMEM+FCS par un mélange DMEM+Hepes.

A.3 Traitements modifiant la structure du cytosquelette

Latrunculine B

La Latrunculine B est conservée à une concentration de $2,5\text{ mM}$ en DMSO et à -20°C .

1. Diluer la solution stock dans le milieu de culture pour obtenir une solution à $5\text{ }\mu\text{M}$.
2. Rincer une fois les cellules dans le milieu de culture.
3. Incuber les cellules dans $400\text{ }\mu\text{L}$ de Latrunculine B diluée à $5\text{ }\mu\text{M}$ à 37°C pendant 15 min.
4. Conserver le même milieu pendant les mesures qui ne devront pas excéder 1 h.

Cytochalasine D

La Cytochalasine D est conservée à une concentration de 10 mM à -20°C , à l'abri de la lumière. Le protocole est inspiré de [Wakatsuki 01] :

1. Préparer une solution de Cytochalasine D diluée à une concentration de $2\text{ }\mu\text{M}$ ou $10\text{ }\mu\text{M}$ dans de DMEM+Hepes 10 mM .
2. Éliminer le milieu de culture et laver en DMEM+Hepes.
3. Incuber en présence de $400\text{ }\mu\text{L}$ de Cytochalasine D diluée à $2\text{ }\mu\text{M}$ ou $10\text{ }\mu\text{M}$ à 37°C pendant 30 min.
4. Laver trois fois en DMEM+Hepes.
5. Les mesures peuvent être réalisées pendant 1 h.

Jasplakinolide

La Jasplakinolide est conservée à une concentration de 1 mM à -20°C, à l'abri de la lumière.

1. Préparer une solution de Jasplakinolide à une concentration de 400 nM en DMEM+Hepes.
2. Éliminer le milieu de culture et laver en DMEM+Hepes.
3. Incuber en présence de 400 μ L Jasplakinolide diluée à 400 nM à 37°C pendant 5 min.
4. Laver deux fois en DMEM+Hepes.
5. Réaliser les mesures en DMEM+Hepes sans FCS ; ne pas étendre les observations au delà d'une heure post-traitement.

A.4 Traitements modifiant la structure en radeaux lipidiques

Méthyl- β -cyclodextrine

La méthyl- β -cyclodextrine est conservée sous forme de poudre. La solution de méthyl- β -cyclodextrine dans HBSS+Hepes doit être réalisée extemporanément.

1. Diluer 13 mg de M β CD dans 1 mL de DMEM+Hepes 10 mM. La solution ainsi obtenue a une concentration d'environ 10 mM en M β CD.
2. Éliminer le milieu de culture d'une cuve *nunc* et laver en DMEM+Hepes.
3. Ajouter 400 μ L de M β CD diluée dans la cuve *nunc*.
4. Incuber à 37°C pendant 10 min.
5. Laver en DMEM+Hepes.
6. La durée d'observation ne doit pas excéder 1 h.

Cholestérol oxydase

La cholestérol oxydase est conservée à une concentration de 1 U/ μ L à -20°C, à l'abri de la lumière.

1. Diluer la cholestérol oxydase à 1 U/mL dans du DMEM+Hepes 10 mM.
2. Laver une cuve *nunc* trois fois en DMEM+Hepes. Il faut éliminer toute trace de sérum car les lipoprotéines présentes dans le FCS sont susceptibles de compenser la déplétion en cholestérol.
3. Ajouter 400 μ L de Cholestérol oxydase diluée à 1 U/mL , en DMEM+Hepes.
4. Incuber à 37°C pendant 1 h dans l'incubateur.
5. Laver deux fois les cellules en DMEM+Hepes.
6. Réaliser les mesures en DMEM+Hepes ; la durée d'observation ne doit pas excéder 1 h. Des mesures ont également été réalisées avec des concentrations en Cholestérol oxydase égales à 0,1 U/mL, 0,5 U/mL et 10 U/mL.

Sphingomyélinase

La sphingomyélinase est conservée à une concentration de 300 U/mL à -20°C, à l'abri de la lumière.

1. Diluer la sphingomyélinase à 0,1 U/mL dans du DMEM+Hepes 10 mM.
2. Laver une cuve *nunc* trois fois en DMEM+Hepes 10 mM.
3. Incuber à 37°C dans 200 μ L de sphingomyélinase diluée à 0,1 U/mL.
4. Rincer en DMEM+Hepes puis observer.

A.5 Autres traitements

Phospholipase C

1. Rincer une cuve *nunc* en HBSS+Hepes.
2. Incuber dans 200 μ L de phospholipase C à une concentration de 1 U/mL à 37°C pendant 15 min.
3. Rincer une fois en HBSS+Hepes.
4. Observation en HBSS+Hepes.

Ajout de sous-unités B de la toxine cholérique

1. Rincer une cuve *nunc* deux fois en HBSS+Hepes.
2. Incuber pendant 15 min à 4°C en présence de CTB marquée et/ou non marquée.
3. Laver deux fois en HBSS+Hepes.
4. Observation en HBSS+Hepes.

Annexe B

Globules rouges : protocoles expérimentaux

B.1 Composition des solutions physiologiques de force ionique élevée et de force ionique faible

Solution de force ionique élevée (solution HIS, pour *High Ionic Strength*)

Cette solution contient :

- NaCl (145 mM),
- KCl (7,5 mM),
- du glucose (10 mM),
- et une solution tampon d'Hepes/Tris à pH=7,40 à la température d'utilisation. Pour réaliser un tel tampon, l'Hepes, sous forme de poudre, est dilué à la concentration de 1 mM et le Tris (1 M) est ajouté afin d'ajuster le pH de la solution. En cas de dépassement du pH de 7,40, il est possible d'ajouter une petite quantité de HCl (1 M) afin de diminuer le pH.

Solution de force ionique faible (solution LIS, pour *Low Ionic Strength*)

Cette solution contient :

- du sucrose (250 mM),
- KCl (7,5 mM),
- du glucose (10 mM),
- et une solution tampon d'Hepes/Tris à pH=7,40 à la température d'utilisation.

Les expériences ont été réalisées avec une solution LIS isotonique, dans laquelle les cellules ont un volume un peu réduit. Il aurait fallu réaliser également les mêmes expériences dans une solution LIS non-isotonique, dans laquelle les cellules ont le même volume que dans la solution HIS. Il faut pour cela fabriquer une deuxième solution LIS dans laquelle le contenu en sucrose est plus faible (200 mM au lieu de 250 mM). Ce travail n'a pas été fait...

B.2 Prélèvement des globules rouges

Tous les globules rouges sur lesquels ont été effectuées les expériences ont été prélevés sur l'auteur.

1. La ponction de sang est réalisée sur le bout du doigt lavé avec application, à l'aide d'une aiguille stérile et d'une pipette de 100 μL . Après avoir piqué le côté du doigt à l'aide de l'aiguille, le doigt est pressé et la goutte de sang est récupérée à l'aide de la pipette.
2. Verser 50 μL de sang dans un tube eppendorf et ajouter 1 mL de solution HIS.

B.3 Marquage des globules rouges par Bodipy-maléimide

1. Centrifuger pendant 1 min à 2000 tr/min. On obtient un culot d'environ 10 μL .
2. Prélever 5 μL de culot et ajouter 2 μL de Bodipy-maléimide. Les globules rouges et le marqueur fluorescent sont mis en contact pendant 12 min.
3. Réaliser ensuite trois lavages en HIS, la centrifugation se faisant pendant 1 min à 1000 tr/min.

Une telle procédure permet d'obtenir des cellules ayant une forme régulière et relativement peu de cellules ayant perdu leur hémoglobine (*ghosts*).

B.4 Marquage des globules rouges par FL-PC et FL-G_{M1}

Le protocole est identique à celui utilisé sur les cellules COS-7 (voir A.2.1), à ceci près que les globules rouges doivent être accrochés artificiellement à la paroi de la cuve *nunc* grâce à la poly-L-lysine.

B.5 Traitements du cytosquelette

L'affaiblissement du réseau de spectrine est réalisable, soit par incubation à 49°C, soit par ajout d'un cation ionophore tel que la nystatine ou l'amphotéricine B.

Traitement par bain-marie

Après marquage, les globules rouges subissent un passage dans un bain-marie à la température de 49°C pendant 15 min.

Traitement par la nystatine

La nystatine est un antibiotique polyénique et doit être conservée à 4°C à l'abri de la lumière. La solution est stockée à une concentration de 30 mM.

Après marquage des globules rouges :

1. Laver 2 fois en HIS.
2. Laver 3 fois en LIS+Nystatin (30 μM). Incuber à chaque fois les cellules 15 min à 4°C avant centrifugation (L'ionophore s'insère mieux dans la membrane à basse température).
3. Laver 3 fois en LIS seul. Travailler à température ambiante (L'ionophore s'extrait de la membrane plus aisément à haute température).
4. Observer les cellules dans HIS après collage des cellules dans une cuve *nunc* préparée préalablement avec de la poly-L-lysine.

Traitement par l'amphotéricine B

L'amphotéricine B est un antibiotique polyénique et doit être conservée à 4°C à l'abri de la lumière. La solution est stockée à une concentration de 30 mM. Après marquage des globules rouges :

1. Laver 2 fois en HIS.
2. Laver 3 fois en LIS+Amphotéricine B (30 μ M). Incuber à chaque fois les cellules 15 min à 4°C avant centrifugation.
3. Laver 3 fois en LIS seul.
4. Observer les cellules dans HIS après collage des cellules dans une cuve *nunc* préparée préalablement avec de la poly-L-lysine.

Annexe C

Résultats expérimentaux

C.1 Vésicules unilamellaires géantes (GUVs)

marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
FL-PC	—	25°C	$-0,2 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,6$

C.2 Globules rouges

marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
FL-MA	—	37°C	$-53,2 \pm 7,8$	$0,097 \pm 0,006$
	49°C	37°C	$-10,3 \pm 7,1$	$0,22 \pm 0,02$
	Nystatine (30 μM)	37°C	$-18,9 \pm 3,5$	$0,17 \pm 0,01$
	Amphot. B (10 μM)	37°C	-12 ± 16	$0,21 \pm 0,04$
	Amphot. B (30 μM)	37°C	$-3,2 \pm 6,4$	$0,27 \pm 0,03$
	Amphot. B (50 μM)	37°C	$-0,60 \pm 1,6$	$0,29 \pm 0,01$
FL-G _{M1}	—	37°C	$0,5 \pm 1,3$	$0,52 \pm 0,03$
	49°C	37°C	$-0,5 \pm 3,7$	$0,52 \pm 0,10$
	Nystatine (30 μM)	37°C	$-0,1 \pm 0,7$	$0,53 \pm 0,03$
	Amphot. B (30 μM)	37°C	$-0,1 \pm 2,2$	$0,51 \pm 0,04$
FL-SM	—	37°C	$0,12 \pm 1,0$	$0,51 \pm 0,02$
	49°C	37°C	$-0,2 \pm 3,1$	$0,52 \pm 0,10$
	Nystatine (30 μM)	37°C	$-0,2 \pm 0,7$	$0,53 \pm 0,03$
	Amphot. B (30 μM)	37°C	$0,4 \pm 1,7$	$0,53 \pm 0,03$
FL-PC	—	37°C	$-0,3 \pm 1,6$	$0,51 \pm 0,03$
	49°C	37°C	$-0,2 \pm 4,0$	$0,5 \pm 0,1$
	Nystatine (30 μM)	37°C	$0,6 \pm 1,4$	$0,54 \pm 0,3$
	Amphot. B (30 μM)	37°C	$0,2 \pm 2,0$	$0,52 \pm 0,03$

C.3 Cellules COS-7

LIPIDES				
marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
FL-G _{M1}	—	25°C	$24,2 \pm 6,7$	$1,3 \pm 0,5$
	COase (0,1 U)	25°C	$4,9 \pm 1,4$	$0,83 \pm 0,05$
	COase (1 U)	25°C	$-0,3 \pm 2,6$	$0,74 \pm 0,07$
	SMase (0,1 U)	25°C	$-0,1 \pm 2,2$	$0,73 \pm 0,05$
	—	37°C	$24,5 \pm 2,9$	$1,35 \pm 0,221$
	Lat B (5 μM)	37°C	$24,9 \pm 1,3$	$1,4 \pm 0,1$
	Cyto D (2 μM)	37°C	$24,2 \pm 1,4$	$1,3 \pm 0,1$
	Jaspla (400 nM)	37°C	$24,1 \pm 1,6$	$1,3 \pm 0,1$
FL-C ₅ -SM	—	25°C	$10,1 \pm 2,0$	$1,3 \pm 0,2$
	COase (0,1 U)	25°C	$5,6 \pm 0,6$	$0,86 \pm 0,04$
	COase (1 U)	25°C	$0,8 \pm 2,4$	$0,76 \pm 0,06$
	Lat B (1 μM)	25°C	$10,6 \pm 3,8$	$1,4 \pm 0,4$
	Cyto D (2 μM)	25°C	$10,3 \pm 2,7$	$1,3 \pm 0,2$
	M β CD	25°C	17 ± 11	$1,6 \pm 1,5$
	—	37°C	$10,4 \pm 2,0$	$1,4 \pm 0,2$
	Jaspla (400 nM)	37°C	$10,5 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,1$
FL-C ₁₂ -SM	—	25°C	$9,7 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,1$
	COase (1 U/mL)	25°C	$-0,4 \pm 3,5$	$0,75 \pm 0,08$
FL-PC	—	25°C	$-0,4 \pm 3,2$	$1,4 \pm 0,2$
	COase (1 U/mL)	"	$0,8 \pm 3,8$	$0,78 \pm 0,11$
	—	37°C	$-0,2 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,1$
FL-PE	—	25°C	$0,2 \pm 2,5$	$1,4 \pm 0,2$
	COase (1 U/mL)	25°C	$-0,9 \pm 0,7$	$0,73 \pm 0,05$
	—	37°C	$0,5 \pm 0,7$	$1,4 \pm 0,1$
PROTÉINES AYANT UNE ANCRE LIPIDIQUE				
marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
GFP-GPI	—	25°C	$11,8 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,1$
	COase (0,1 U/mL)	25°C	$5,18 \pm 1,3$	$0,90 \pm 0,05$
	COase (1 U/mL)	25°C	$-0,2 \pm 1,8$	$0,74 \pm 0,04$
	COase (10 U/mL)	25°C	$0,4 \pm 3,6$	$0,76 \pm 0,10$
	SMase (0,01 U)	25°C	$10,8 \pm 0,9$	$1,02 \pm 0,05$
	SMase (0,03 U)	25°C	$6,1 \pm 1,4$	$0,88 \pm 0,04$
	SMase (0,1 U)	25°C	$-0,6 \pm 0,5$	$0,73 \pm 0,04$
	SMase (1 U)	25°C	$0,1 \pm 1,0$	$0,73 \pm 0,04$
	M β CD (10 mM)	25°C	22 ± 8	$1,4 \pm 0,8$
	M β CD (40 mM)	25°C	$28,0 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,1$
	Lat B (5 μM)	25°C	$13,2 \pm 5,8$	$1,1 \pm 0,3$
	Cyto D (10 μM)	25°C	$10,9 \pm 1,3$	$1,10 \pm 0,08$
	COase (1 U/mL) + Lat B (5 μM)	25°C	$-0,3 \pm 2,7$	$0,8 \pm 0,1$
	—	37°C	$12,1 \pm 2,5$	$1,1 \pm 0,1$
	COase (1 U/mL)	37°C	$0,2 \pm 0,8$	$0,75 \pm 0,04$
	Jaspla (400 nM)	37°C	$11,7 \pm 0,7$	$1,03 \pm 0,05$
	COase (1 U/mL) + catalase	37°C	$0,1 \pm 0,7$	$0,76 \pm 0,04$
	Phospholipase C (1 U/mL)	37°C	$11,9 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,1$

PROTÉINES AYANT UNE ANCRE LIPIDIQUE (SUITE)				
marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
Thy1-GFP	—	37°C	$18,4 \pm 1,7$	$1,1 \pm 0,1$
	COase (1 U/mL)	37°C	$0,1 \pm 1,2$	$0,75 \pm 0,04$
	SMase (0,1 U)	37°C	$0,2 \pm 1,3$	$0,75 \pm 0,04$
	Lat B (5 μM)	37°C	$17,2 \pm 0,5$	$1,04 \pm 0,06$
PROTÉINES TRANSMEMBRANAIRES				
marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
GFP-TfR	—	25°C	$7,9 \pm 0,9$	$0,76 \pm 0,03$
	COase (1 U/mL)	25°C	$-1,0 \pm 0,6$	$0,76 \pm 0,04$
	Lat B (5 μM)	25°C	$7,5 \pm 2,1$	$0,76 \pm 0,06$
	—	37°C	$-20,4 \pm 1,9$	$0,27 \pm 0,01$
	COase (1 U/mL)	37°C	$-28,4 \pm 5,2$	$0,26 \pm 0,03$
	SMase (0,1 U)	37°C	$-27,8 \pm 3,2$	$0,26 \pm 0,01$
	Lat B (5 μM)	37°C	$-3,2 \pm 1,9$	$0,76 \pm 0,04$
	Cyto D (2 μM)	37°C	$-0,7 \pm 2,8$	$0,47 \pm 0,02$
	Cyto D (10 μM)	37°C	$7,8 \pm 1,6$	$0,78 \pm 0,04$
	Jaspla (400 nM)	37°C	$-36,5 \pm 5,4$	$0,20 \pm 0,01$
	COase (1 U/mL) + Lat B (5 μM)	37°C	$-13,1 \pm 2,2$	$0,35 \pm 0,02$
	COase (1 U/mL) + Cyto D (10 μM)	37°C	$-0,1 \pm 0,9$	$0,35 \pm 0,02$
	SMase (0,1 U) + Lat B (5 μM)	37°C	$-11,5 \pm 1,3$	$0,35 \pm 0,02$
GFP-DPP _{IV}	—	25°C	$9,3 \pm 4,1$	$0,79 \pm 0,11$
	COase (1 U/mL)	25°C	$-0,2 \pm 2,0$	$0,73 \pm 0,05$
	Lat B (5 μM)	25°C	$10,2 \pm 3,6$	$1,3 \pm 0,5$
	—	37°C	$4,8 \pm 1,7$	$0,58 \pm 0,03$
	COase (1 U/mL)	37°C	$-3,5 \pm 1,1$	$0,46 \pm 0,02$
	SMase (0,1 U)	37°C	$-4,8 \pm 2,3$	$0,45 \pm 0,02$
	Lat B (5 μM)	37°C	$8,5 \pm 4,3$	$0,75 \pm 0,10$
	Cyto D (2 μM)	37°C	$9,1 \pm 1,6$	$0,76 \pm 0,04$
	Cyto D (10 μM)	37°C	$8,9 \pm 1,9$	$0,77 \pm 0,04$
	Jaspla (400 nM)	37°C	$-6,1 \pm 0,8$	$0,39 \pm 0,02$
	COase (1 U/mL) + Lat B (5 μM)	37°C	$-2,3 \pm 1,7$	$0,48 \pm 0,02$
	COase (1 U/mL) + Cyto D (10 μM)	37°C	$0,2 \pm 1,2$	$0,52 \pm 0,03$
EXPÉRIENCES DE RÉTICULATION DU G _{M1}				
marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
GFP-GPI	Toxine B du Cholera (100 nM)	37°C	$11,5 \pm 1,0$	$1,02 \pm 0,05$
FL-G _{M1}	Toxine B du Cholera (100 nM)	37°C	$14,3 \pm 0,8$	$0,69 \pm 0,03$
Alexa-CTB (10 nM)	Toxine B du Cholera (100 nM)	37°C	$1,6 \pm 4,6$	$0,43 \pm 0,04$

C.4 Cellules 3A9

Expériences réalisées sur un premier clone non activable				
marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
FL-G _{M1}	—	25°C	$14,8 \pm 5,4$	$0,78 \pm 0,29$
	déplétion métabolique	25°C	$-0,2 \pm 2,6$	$0,70 \pm 0,06$
FL-PC	—	25°C	$0,3 \pm 5,7$	$0,76 \pm 0,27$
ζ 3-YFP	—	25°C	$25,3 \pm 1,1$	$0,88 \pm 0,04$
	déplétion métabolique	25°C	$0,5 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,04$
	SMase C (5 U/mL)	25°C	$0,6 \pm 2,9$	$0,72 \pm 0,07$
Expériences réalisées sur un deuxième clone activable				
marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
ζ 3-YFP	—	37°C	$-1,84 \pm 2,1$	$0,30 \pm 0,01$
	déplétion métabolique	37°C	$-18,8 \pm 9,1$	$0,33 \pm 0,05$
	Lat A (1 μM)	37°C	$25,1 \pm 9,0$	$0,86 \pm 0,03$
	déplétion métabolique + Lat A	37°C	$0,2 \pm 9,8$	$0,41 \pm 0,08$
	(1 μM)			

C.5 Cellules Jurkat

marqueur	traitement	temp.	t_0 (ms)	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
ζ 3-GFP	—	37°C	$23,3 \pm 2,5$	$0,82 \pm 0,07$
	déplétion métabolique	37°C	$-9,1 \pm 9,9$	$0,30 \pm 0,05$
	Lat A (1 μM)	37°C	$30,7 \pm 0,2$	$1,70 \pm 0,02$
	PP2 (10 μM)	37°C	$-5,2 \pm 3,9$	$0,34 \pm 0,02$
	wortmannine	37°C	$18,7 \pm 1,0$	$0,54 \pm 0,01$

Bibliographie

- [Alberts 02] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. Garland Publishing, New York, 2002.
- [Almeida 05] P.F.F. Almeida, A. Pokorný & A. Hinderliter. *Thermodynamics of membrane domains*. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1720, pages 1–13, 2005.
- [Amyere 01] M. Amyere. *Régulation de la macropinocytose constitutive dans les fibroblastes transformés par les oncogènes*. PhD thesis, Université catholique de Louvain - faculté de médecine, 2001.
- [Anderson 02] R.G. Anderson & K. Jacobson. *A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains*. *Science*, vol. 296, pages 1821–1825, 2002.
- [Ashcroft 80] R.G. Ashcroft, K.R. Thulborn, J.R. Smith, H.G. Coster & W.H. Sawyer. *Perturbations to lipid bilayers by spectroscopic probes as determined by dielectric measurements*. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 602, pages 299–308, 1980.
- [Bacia 04] K. Bacia, C.G. Schuette, N. Kahya, R. Jahn & P. Schwille. *SNAREs prefer liquid-disordered over "raft" (liquid-ordered) domains when reconstituted into giant unilamellar vesicles*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pages 37951–37955, 2004.
- [Bagatolli 00] L.A. Bagatolli & E. Gratton. *Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures*. *Biophysical Journal*, vol. 78, pages 290–305, 2000.
- [Berg 02] J.M. Berg, J.L. Tymoczko & L. Stryer. *Biochemistry*. Freeman and Co., New York, 2002.
- [Berridge 87] M.J. Berridge. *Inositol trisphosphate and diacylglycerol : two interacting second messengers*. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 56, pages 159–193, 1987.
- [Beuthan 96] J. Beuthan, O. Minet, J. Helfman & G. Muller. *The spatial variation of the refractive index in biological cells*. *Physics in Medicine and Biology*, vol. 41, pages 369–382, 1996.
- [Bouchaud 90] J.P. Bouchaud & A. Georges. *Anomalous diffusion in disordered media : statistical mechanisms*. *Physics Report*, vol. 195, pages 127–167, 1990.
- [Bretscher 85] M.S. Bretscher. *The molecules of the cell membrane*. *Scientific American*, vol. 253, pages 86–90, 1985.

- [Brock 98] R. Brock & T.M. Jovin. *Fluorescence correlation microscopy (FCM)-fluorescence correlation spectroscopy (FCS) taken into the cell*. Cell Molecular Biology, vol. 44, pages 847–856, 1998.
- [Bromley 01] S.K. Bromley, W.R. Burack, K.G. Johnson, K. Somersalo, T.N. Sims, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen & M.L. Dustin. *The immunological synapse*. Annual Review of Immunology, vol. 19, pages 375–396, 2001.
- [Brown 92] D. Brown & J. Rose. *Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface*. Cell, vol. 68, page 533–544, 1992.
- [Brown 00] D. Brown & E. London. *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. Journal of Biological Chemistry, vol. 275, pages 17221–17224, 2000.
- [Bussell 95] S.J. Bussell, D.L. Koch & D.A. Hammer. *Effect of hydrodynamic interactions on the diffusion of integral membrane proteins : tracer diffusion in organelle and reconstituted membranes*. Biophysical Journal, vol. 68, pages 1828–1835, 1995.
- [Carey 00] M. Carey & S.T. Smale. *Transcriptional regulation in eukaryotes : Concepts, strategies and techniques*. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [Cole 96] N.B. Cole, C.L. Smith, N. Sciaky, M. Terasaki, M. Edidin & J. Lippincott-Schwartz. *Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells*. Science, vol. 273, pages 797–801, 1996.
- [Cooper 00] G.M. Cooper. *The cell : a molecular approach*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, second edition, 2000.
- [Coue 87] M. Coue, S.L. Brenner, I. Spector & E.D. Korn. *Inhibition of actin polymerization by latrunculin A*. FEBS Letters, vol. 213, pages 316–318, 1987.
- [Cézanne 04] L. Cézanne, S. Lecat, B. Lagane, C. Millot, J.-Y. Vollmer, H. Matthes, J.-L. Galzi & A. Lopez. *Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 279, pages 45057–45067, 2004.
- [da Silva 70] P. da Silva & Branton D. *Membrane splitting in freeze etching*. Journal of Cell Biology, vol. 45, pages 598–605, 1970.
- [Danielli 35] J.H. Danielli & H. Davson. *A contribution to the theory of permeability of thin films*. Journal of Cell and Comparative Physiology, vol. 5, pages 495–508, 1935.
- [Daumas 03] F. Daumas, N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean & L. Salomé. *Confined diffusion without fences of a G-protein-coupled receptor as revealed by Single Particle Tracking*. Biophysical Journal, vol. 84, pages 356–366, 2003.
- [de la Serna 04] J.B. de la Serna, J. Perez-Gil, A.C. Simonsen & L.A. Bagatolli. *Cholesterol rules : direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures*. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, pages 40715–40722, 2004.

-
- [Debye 09] P. Debye. *Das Verhalten von Lichtwellen in der Nähe eines Brennpunktes oder einer Brennnlinie*. Annalen der Physik, vol. 30, page 755, 1909.
- [Delon 04] A. Delon, Y. Usson, J. Derouard, T. Biben & C. Souchier. *Photobleaching, Mobility, and Compartmentalisation : Inferences in Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Journal of Fluorescence, vol. 14, pages 255–267, 2004.
- [Dietrich 01] C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson & L.A. Gratton. *Lipid rafts reconstituted in model membranes*. Biophysical Journal, vol. 80, pages 1417–1428, 2001.
- [Dietrich 02] C. Dietrich, B. Yang, T. Fujiwara, A. Kusumi & K. Jacobson. *Relationship of lipid rafts to Transient Confinement Zones detected by Single Particle Tracking*. Biophysical Journal, vol. 82, pages 274–284, 2002.
- [Drevot 02] P. Drevot, C. Langlet, X.-J. Guo, A.-M. Bernard, O. Colard, J.-P. Chauvin, R. Lasserre & H.-T. He. *TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts*. The EMBO Journal, vol. 21, pages 1899–1908, 2002.
- [Du 98] H. Du, R.A. Fuh, J. Li, A. Corkan & J.S. Lindsey. *PhotochemCAD : A computer-aided design and research tool in photochemistry*. Photochemistry and Photobiology, vol. 68, pages 141–142, 1998.
- [Dunn 98] A. Dunn. Light scattering properties of cells. Master’s thesis, University of Texas, Austin, 1998.
- [Edidin 91a] M. Edidin, S.C. Kuo & M.P. Sheetz. *Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers*. Science, vol. 254, pages 1379–1382, 1991.
- [Edidin 91b] M. Edidin & I. Stroynowski. *Differences between the lateral organization of conventional and inositol phospholipid-anchored membrane proteins. A further definition of micrometer scale membrane domains*. The Journal of Cell Biology, vol. 112, pages 1143–1150, 1991.
- [Edidin 94] M. Edidin, M.C. Zuniga & M.P. Sheetz. *Truncation mutants define and locate cytoplasmic barriers to lateral mobility of membrane glycoproteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 91, pages 3378–3382, 1994.
- [Elson 74] E.L. Elson & D. Magde. *Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, vol. 13, pages 1–27, 1974.
- [Elson 76] E.L. Elson, J. Schlessinger, D.E. Koppel, D. Axelrod & W.W. Webb. *Measurement of lateral transport on cell surfaces*. Progress in Clinical and Biological Research, vol. 9, pages 137–47, 1976.
- [Estes 81] J. E. Estes, L. A. Selden & L. C. Gershman. *Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin*. Biochemistry, vol. 20, pages 708–712, 1981.
- [Fahey 77] P. F. Fahey, D. E. Koppel, L. S. Barak, D. E. Wolf, E. L. Elson & W. W. Webb. *Lateral diffusion in planar lipid bilayers*. Science, vol. 195, pages 305–306, 1977.
- [Frye 70] L.D. Frye & M. Edidin. *The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons*. Journal of Cell Science, vol. 7, pages 319–335, 1970.

- [Fujiwara 02] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson & A. Kusumi. *Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane*. Journal of cell biology, vol. 157, pages 1071–1081, 2002.
- [Gascoigne 01] N.R.J. Gascoigne, Zal T. & S.M. Alam. *T-cell receptor binding kinetics in T-cell development and activation*. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001.
- [Gennerich 00] A. Gennerich & D. Schild. *Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used*. Biophysical Journal, vol. 79, pages 3294–3306, 2000.
- [Gennerich 02] A. Gennerich & D. Schild. *Anisotropic diffusion in mitral cell dendrites revealed by fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical Journal, vol. 83, pages 510–522, 2002.
- [Giocondi 04] M.-C. Giocondi, P.-E. Milhiet, P. Dosset & C. Le Grimmellec. *Use of Cyclodextrin for AFM monitoring of model raft formation*. Biophysical Journal, vol. 86, pages 861–869, 2004.
- [Glaser 79] R. Glaser. *The shape of red blood cells as a function of membrane potential and temperature*. Journal of Membrane Biology, vol. 51, pages 217–228, 1979.
- [Gorter 25] E. Gorter & F. Grendel. *On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood*. Journal of Experimental Medicine, vol. 41, no. 4, pages 439–443, 1925.
- [Hao 01] M. Hao, S. Mukherjee & F.R. Maxfield. *Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 98, pages 13072–13077, 2001.
- [Heerklotz 02] H. Heerklotz. *Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures*. Biophysical Journal Volume November, vol. 83, pages 2693–2701, 2002.
- [Heller 93] H. Heller, M. Schaefer & K. Schulten. *Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid crystal phases*. Journal of Physical Chemistry, vol. 97, pages 8343–8360, 1993.
- [Hess 02] S.T. Hess & W.W. Webb. *Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence spectroscopy*. Biophysical Journal, vol. 83, pages 2300–2317, 2002.
- [Hivroz 04] C. Hivroz. *ZAP-70, une kinase indispensable à l'activation des lymphocytes T, impliquée dans l'auto-immunité*. Médecine/Sciences, vol. 20, 2004.
- [Hooke 65] R. Hooke. *Micrographia or some physiological descriptions of minutes bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon*. Royal Society of London, 1665.
- [Humpolícková 06] J. Humpolícková, E. Gielen, A. Benda, V. Fagulova, J. Vercammen, M. vandeVen, M. Hof, M. Ameloot & Y. Engelborghs. *Probing diffusion laws within cellular membranes by Z-scan fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical Journal, vol. published on June 2, 2006 as doi :10.1529/biophysj.106.089474, 2006.
- [Jacobson 95] K. Jacobson, E.D. Sheets & R. Simson. *Revisiting the fluid mosaic model of membranes*. Science, vol. 268, pages 1441–1442, 1995.

-
- [Jain 77] M.K. Jain & H.B. White. *Long-range order in biomembranes*. Advances in lipid research, vol. 15, pages 1–60, 1977.
- [Kahya 01] N. Kahya, E.I. Pécheur, W.P. de Boeij, D.A. Wiersman & D. Hoekstra. *Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide-Induced Fusion*. Biophysical Journal, vol. 81, pages 1464–1474, 2001.
- [Kahya 03] N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, B. Poolman & P. Schuille. *Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of Biochemical Chemistry, vol. 278, pages 28109–28115, 2003.
- [Kenworthy 04] A.K. Kenworthy, B.J. Nichols, C.L. Remmert, G.M. Hendrix, M. Kumar, J. Zimmerberg & J. Lippincott-Schwartz. *Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface*. The Journal of Cell Biology, vol. 165, pages 735–746, 2004.
- [Klonis 02] N. Klonis, M. Rug, I. Harper, M. Wickham, A. Cowman & L. Tilley. *Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics*. European Biophysics Journal, vol. 31, pages 36–51, 2002.
- [Kohl 97] M. Kohl & M. Cope. *Influence of glucose concentration on light scattering in tissue*. Optics Letters, vol. 17, pages 2170–2172, 1997.
- [Koopman 04] M. Koopman, A. Cambi, B.I. de Bakker, B. Joosten, C.G. Figdor, N.F. van Hulst & M.F. Garcia-Parajo. *Near-field scanning optical microscopy in liqui for high resolution single molecule detection on dendritic cells*. FEBS Letters, vol. 573, pages 6–10, 2004.
- [Koppel 76] D.E. Koppel, D. Axelrod, J. Schlessinger, E.L. Elson & W.W. Webb. *Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility*. Biophysical Journal, vol. 16, pages 1315–1329, 1976.
- [Lasic 93] D.D. Lasic. *Liposomes : from physics to applications*. Elsevier, New York, 1993.
- [Lenne 02] P.-F. Lenne, E. Etienne & H. Rigneault. *Subwavelength patterns and high detection efficiency in fluorescence correlation spectroscopy using photonic structures*. Applied Physics Letters, vol. 80, pages 4106–4108, 2002.
- [Levin 01] M.H. Levin, P.M. Haggie, L. Vetrivel & A.S. Verkman. *Diffusion in the endoplasmic reticulum of an aquaporin-2 mutant causing human nephrogenic diabetes insipidus*. Journal of Biological Chemistry, vol. 276, pages 21331–21336, 2001.
- [Lichtenberg 05] D. Lichtenberg, F. Gon & H. Heerklotz. *Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts*. Trends in Biochemical Sciences, vol. 30, pages 430–436, 2005.
- [Limozin 03] L. Limozin, M. Bärmann & E. Sackmann. *On the organization of self-assembled actin networks in giant vesicles*. The European Physical Journal, vol. 10, pages 319–330, 2003.
- [Liu 87] S.-C. Liu, L.H. Derick & J. Palek. *Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton*. The Journal of Cell Biology, vol. 104, pages 527–536, 1987.

- [Liu 93] S.Q. Liu & P.A. Knauf. *Lys-430, site of irreversible inhibition of band 3 Cl⁻ flux by eosin-5-maleimide, is not at the transport site*. American Journal of Physiology, vol. 264, pages 1155–1164, 1993.
- [Liu 96] H. Liu, B. Beauvoit, M. Kimura & B. Chance. *Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity*. Journal of Biomedical Optics, vol. 1, pages 200–211, 1996.
- [Lowin-Kropf 98] B. Lowin-Kropf, V.S. Shapiro & A. Weiss. *Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism*. Journal of Cell Biology, vol. 140, pages 861–71, 1998.
- [Macdonald 05] J.L. Macdonald & L.J. Pike. *A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts*. Journal of Lipid Research, vol. 46, pages 1061–1067, 2005.
- [Madore 99] N. Madore, K.L. Smith, C.H. Graham, A. Jen, K. Brady, S. Hall & R. Morris. *Functionally different GPI protens are organized in different domains in the neuronal surface*. The EMBO Journal, vol. 18, pages 6917–6926, 1999.
- [Magde 72] D. Magde, E.S. Elson & W.W. Webb. *Thermodynamic fluctuations in a reacting system. Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Physical Review Letters, vol. 29, page 705, 1972.
- [Maier 02] O. Maier, V. Oberle & D. Hoekstra. *Fluorescent lipid probes : some properties and applications (a review)*. Chemistry and Physics of Lipids, vol. 116, pages 3–18, 2002.
- [Marguet 99] D. Marguet, E.T. Spiliotis, T. Pentcheva, M. Lebowitz, J. Schneck & M. Edidin. *Lateral diffusion of GFP-tagged H2Ld molecules and of GFP-TAP1 reports on the assembly and retention of these molecules in the endoplasmic reticulum*. Immunity, vol. 11, pages 231–240, 1999.
- [Masuda 05] A. Masuda, K. Ushida & T. Okamoto. *New Fluorescence Correlation Spectroscopy enabling direct observation of spatiotemporal dependence of diffusion constants as an evidence of nomalous transport in extracellular matrices*. Biophysical Journal, vol. 88, pages 3584–3591, 2005.
- [Merritt 94] E.A. Merritt, S. Sarfaty, F.V.D. Akker, C. L'Hoir, J. A. Martial & W.G.J. Hol. *Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor G(M1) pentasaccharide*. Protein Science, vol. 3, pages 166–175, 1994.
- [Montixi 98] C. Montixi, C. Langlet, A.-M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M.-A. Wurbel, J.-P. Chauvin, M. Pierres & H.-T. He. *Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains*. The EMBO Journal, vol. 17, pages 5334–5348, 1998.
- [Munro 03] S. Munro. *Lipid rafts : elusive or illusive ?* Cell, vol. 115, pages 377–388, 2003.
- [Nagle 82] J.F. Nagle & D.A. Wilkinson. *Dilatometric studies of the subtransition in DPPC*. Biochemistry, vol. 21, pages 3817–3821, 1982.
- [Nigg 80] E.A. Nigg & R.J. Cherry. *Anchorage of a band 3 population at the erythrocyte cytoplasmic membrane surface : protein rotational diffusion*

-
- measurements*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 77, pages 4702–4706, 1980.
- [Ohvo-Rekila 02] H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P. Leppimäki & J.P. Slotte. *Cholesterol interactions with phospholipids in membranes*. Progress in lipid research, vol. 41, pages 66–97, 2002.
- [Overton 99] E. Overton. *The probable origin and physiological significance of cellular osmotic properties*. Vierteljahrsschrift der Naturforschende Gesellschaft, vol. 44, pages 88–135, 1899.
- [Pagano 98] R.E. Pagano & O.C. Martin. Cell biology : a laboratory handbook, volume 2. Cell biology : a laboratory handbook, 1998.
- [Paratcha 02] G. Paratcha & C.F. Ibanez. *Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system*. Current Opinion in Neurobiology, vol. 12, pages 542–549, 2002.
- [Pawley 95] J.B. Pawley. Handbook of biological confocal microscopy. Plenum Publishing, 1995.
- [Pencer 04] J. Pencer, R. Dimova & R. Lipowski. *Differences in the influence of cholesterol on sope and dopc and their mixing behaviour with dppc : implications for lateral segregation in model raft mixtures*. In Biophysical Journal annual meeting abstracts, volume 86, page 378A, 2004.
- [Pencer 05] J. Pencer, T. Mills, V. Anghel, S. Krueger, R. M. Epand & J. Katsaras. *Detection of submicron-sized raft-like domains in membranes by small-angle neutron scattering*. The European Physical Journal E - Soft Matter, vol. 18, pages 447–458, 2005.
- [Pollard 93] T.D. Pollard. Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins, chapitre Actin and actin-binding proteins, pages 3–11. Oxford University Press, 1993.
- [Pralle 00] A. Pralle, P. Keller, E.-L. Florin, K. Simons & J.K.H. Hörber. *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*. The Journal of Cell Biology, vol. 148, pages 997–1008, 2000.
- [Pramanik 04] A. Pramanik & J. Widengren. Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine, chapitre Fluorescence Correlation Spectroscopy. Wiley, 2004.
- [Prior 03] I.A. Prior, C. Muncke, R.G. Parton & J.F. Hancock. *Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains*. The Journal of Cell Biology, vol. 160, pages 165–170, 2003.
- [Probes 03] Molecular Probes. *NBD- and BODIPY Dye-Labeled Sphingolipids*. Product Information, 2003.
- [Ramstedt 02] B. Ramstedt & J.P. Slotte. *Membrane properties of sphingomyelins*. FEBS Letters, vol. 531, pages 33–37, 2002.
- [Richards 59] B. Richards & E. Wolf. *Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system*. Proceedings of the Royal Society of London A, vol. 253, pages 358–379, 1959.
- [Rigler 93] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren & P. Kask. *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background : analysis of translational diffusion*. European Biophysics Journal, vol. 22, pages 169–175, 1993.

- [Ripley 77] B. D. Ripley. *Modelling spatial patterns*. Journal of the Royal Statistical Society, vol. B39, pages 172–212, 1977.
- [Robertson 59] J.D. Robertson. *The ultrastructure of cell membranes and their derivatives*. Biochemical Society Symposium, vol. 16, pages 3–43, 1959.
- [Robertson 64] J.D. Robertson. Cellular membranes in development, chapitre Unit membranes : a review with recent new studies of experimental alterations and a new subunit structure in synaptic membranes, pages 1–81. New York/London Academic, 1964.
- [Rotblat 04] B. Rotblat, I.A. Prior, C. Muncke, R.G. Parton, Y. Kloog, Y.I. Henis & J.F. Hancock. *Three separable domains regulate GTP-dependent association of H-Ras with the plasma membrane*. Molecular and Cellular Biology, vol. 24, pages 6799–6810, 2004.
- [Rothberg 92] K.G. Rothberg, J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney & R.G. Anderson. *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, vol. 68, pages 673–682, 1992.
- [Ryan 88] T.A. Ryan, J. Myers, D. Holowka, B. Baird & W.W. Webb. *Molecular crowding on the cell surface*. Science, vol. 239, pages 61–64, 1988.
- [Saffman 75] P.G. Saffman & M. Delbruck. *Brownian motion in biological membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 72, pages 3111–3113, 1975.
- [Salomé 98] L. Salomé, J.-L. Cazeils, A. Lopez & J.-F. Toccanne. *Characterization of membrane domains by frap experiments at variable observation areas*. European Biophysics Journal, vol. 27, pages 391–402, 1998.
- [Sandeau 05] N. Sandeau. *4 π -microscopie : applications à la localisation axiale de luminophores et à l'amélioration de la résolution latérale*. PhD thesis, Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Institut Fresnel, 2005.
- [Saxton 93] M.J. Saxton. *Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion*. Biophysical Journal, vol. 64, pages 1766–1780, 1993.
- [Schatzel 85] K. Schatzel. *New concepts in correlator design*. Institute of Physics Conference Series, vol. 77, pages 175–184, 1985.
- [Schönle 98] A. Schönle & S.W. Hell. *Heating by absorption in the focus of an objective lens*. Optics Letters, vol. 23, pages 325–327, 1998.
- [Schram 94] V. Schram, J.-F. Toccanne & A. Lopez. *Influence of obstacles on lipid lateral diffusion : computer simulation of FRAP experiments and application to proteoliposomes and biomembranes*. European Biophysics Journal, vol. 23, pages 337–348, 1994.
- [Schuck 03] S. Schuck, M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko & K. Simons. *Resistance of cell membranes to different detergents*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 100, pages 5795–5800, 2003.
- [Schwille 01] P. Schwille & E. Haustein. *Fluorescence Correlation Spectroscopy : an introduction to its concepts and applications*. Biophysics Textbook Online, 2001.
- [Schwille 04] P. Schwille. *Strengths and Limitations of FCS as Applied to Microdomains*. In Probing Membrane Microdomains, Asilomar, 2004. Biophysical Society Discussions.

-
- [Sergé 05] A. Sergé. *Microscopie en lumière blanche et par fluorescence*. Polycopié de cours, Université Aix-Marseille II, 2005.
- [Sharma 04] P. Sharma, R. Varma, R.C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao & S. Mayor. *Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes*. *Cell*, vol. 116, pages 577–589, 2004.
- [Sheets 97] E. D. Sheets, G. M. Lee, R. Simson & K. Jacobson. *Transient confinement of a glycosylphosphatidyl-anchored protein in the plasma membrane*. *Biochemistry*, vol. 36, pages 12449–12458, 1997.
- [Sheetz 80] M.P. Sheetz, M. Schindler & D.E. Koppel. *Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes*. *Nature*, vol. 285, pages 510–512, 1980.
- [Sheetz 89] M.P. Sheetz, S. Turney, H. Qian & E.L. Elson. *Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein*. *Nature*, vol. 340, pages 284–288, 1989.
- [Shimshick 73] E.J. Shimshick & H.M. McConnell. *Lateral phase separation in phospholipid membranes*. *Biochemistry*, vol. 12, pages 2351–2360, 1973.
- [Silva 06] L. Silva, A. Coutinho, A. Fedorov & M. Prieto. *Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin. A fluorescence study*. *Biophysical Journal*, vol. 90, pages 3625–3631, 2006.
- [Silvius 03] J.R. Silvius. *Role of cholesterol in lipid raft formation : lessons from lipid model systems*. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1610, pages 174–183, 2003.
- [Simons 88] K. Simons & G. Van Meer. *Lipid sorting in epithelial cells*. *Biochemistry*, vol. 27, pages 6197–6202, 1988.
- [Simons 97] K. Simons & E. Ikonen. *Functional rafts in cell membranes*. *Nature*, vol. 387, pages 569–572, 1997.
- [Simons 00] K. Simons & D. Toomre. *Lipid rafts and signal transduction*. *Nature Review of Molecular Cell Biology*, vol. 1, pages 31–39, 2000.
- [Simson 95] R. Simson, E. D. Sheets & K. Jacobson. *Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single tracking analysis*. *Biophysical Journal*, vol. 69, pages 989–993, 1995.
- [Singer 72] S.J. Singer & G.L. Nicolson. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science*, vol. 175, pages 720–731, 1972.
- [Spector 99] I. Spector, F. Braet, N.R. Shochet & M.R. Bubb. *New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton*. *Microscopy Research and Technique*, vol. 47, pages 18–37, 1999.
- [Subczynski 03] W.K. Subczynski & A. Kusumi. *Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes : approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes*, vol. 1610, pages 231–243, 2003.
- [Svitkina 97] T.M. Svitkina, A.B. Verkhovski & G.G. Borisy. *Recent advances in microscopy of cells, tissues and organs, chapitre Electron microscopy of the cytoskeleton of cultures cells*, pages 93–100. Antonio Delfino Editore, 1997.

- [Tanford 80] C. Tanford. The hydrophobic effect. Wiley, New York, 1980.
- [Tomishige 98] M. Tomishige, Y. Sako & A. Kusumi. *Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton*. The Journal of Cell Biology, vol. 142, pages 989–1000, 1998.
- [Tristram-Nagle 87] S. Tristram-Nagle, M.C. Wiener, C.-P. Yang & J.F. Nagle. *Kinetics of the subtransition in dipalmitoylphosphatidylcholine dispersions*. Biochemistry, vol. 26, pages 4288–4294, 1987.
- [Unwin 84] N. Unwin & R. Henderson. *The structure of proteins in biological membranes*. Scientific American, vol. 250, no. 2, pages 78–94, 1984.
- [Urbanik 89] E. Urbanik & B.R. Ware. *Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H*. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 269, pages 181–187, 1989.
- [Van Meer 88] G. Van Meer & K. Simons. *Lipid polarity and sorting in epithelial cells*. Journal of Cellular Biochemistry, vol. 36, pages 51–58, 1988.
- [Veatch 02] S.L. Veatch & S.L. Keller. *Lateral organization in lipid membranes containing cholesterol*. Physics Review Letters, vol. 89, page ?, 2002.
- [Veatch 03] S.L. Veatch, I.V. Polozov, K. Gawrisch & S.L. Keller. *Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy*. Biophysical Journal, vol. 85, page 2004, 2003.
- [Veatch 04] S.L. Veatch. *Liquid immiscibility in model bilayer lipid membranes*. PhD thesis, University of Washington, 2004.
- [Vist 90] M.R. Vist & J.H. Davis. *Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixture : ^2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry*. Biochemistry, vol. 29, pages 451–464, 1990.
- [Vitkin 96] I. Vitkin, J. Woolsey, B. Wilson & R. Anderson. *Optical and thermal characterization of natural (sepia officinalis) melanin*. Photochemistry and Photobiology, vol. 59, pages 455–462, 1996.
- [Wakatsuki 01] T. Wakatsuki, B. Schwab, N.C. Thompson & E.L. Elson. *Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells*. Journal of Cell Science, vol. 114, pages 1025–1036, 2001.
- [Wawrezinieck 04] L. Wawrezinieck, P.-F. Lenne & D. Marguet. *Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws : application to live cell membrane*. Proceedings of SPIE, vol. 5462, pages 92–102, 2004.
- [Weber 92] A. Weber, V.T. Nachmias, C.R. Pennise, M. Pring & D. Safer. *Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin : implications for actin sequestration in resting platelets*. Biochemistry, vol. 31, pages 6179–6185, 1992.
- [Wenger 06] J. Wenger, F. Conchonaud, J. Dintinger, L. Wawrezinieck, T.W. Ebbesen, D. Marguet, H. Rigneault & P.-F. Lenne. *Single nanometric apertures to probe submicron confinement zones in living cell membranes below the diffraction limit*. to be published, 2006.
- [Wilson 04] B.S. Wilson, S.L. Steinberg, K. Liederman, J.R. Pfeiffer, Z. Surviladze, J. Zhang, L.E. Samelson, L.H. Yang, P.G. Kotula & J.M. Oliver. *Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes*. Molecular Biology of the Cell, vol. 15, pages 2580–2592, 2004.

-
- [Wolf 59] E. Wolf. *Electromagnetic diffraction in optical systems. I. An integral representation of the image field*. Proceedings of the Royal Society of London A, vol. 253, pages 349–357, 1959.
- [Xavier 98] R. Xavier, T. Brennan, Q. Li, C. McCormack & B. Seed. *Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation*. Immunity, vol. 8, pages 723–32, 1998.
- [Yahara 82] I. Yahara, F. Harada, S. Sekita, K. Yoshihira & S. Natori. *Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro*. Journal of Cell Biology, vol. 92, pages 69–78, 1982.
- [Yamada 55] Yamada. *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, vol. 1, page 455, 1955.
- [Yeagle 85] P.L. Yeagle. *Cholesterol and the cell membrane*. Biochimica and Biophysica Acta, vol. 822, pages 267–287, 1985.
- [Yechiel 87] E. Yechiel & M. Edidin. *Micrometer-scale domains in fibroblast plasma membranes*. The Journal of Cell Biology, vol. 105, pages 755–760, 1987.

Résumé

Dans la description actuelle de la membrane plasmique, des hétérogénéités ou des mécanismes sont supposés empêcher la libre diffusion des particules membranaires. La diffusion des protéines transmembranaires serait ainsi ralentie par le réseau d'actine du cytosquelette, alors que les microdomaines lipidiques confinaient transitoirement les molécules impliquées dans les voies de signalisation. La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une technique puissante permettant de mesurer des coefficients de diffusion. L'étude devient cependant malaisée lorsque la diffusion n'est pas libre, comme c'est le cas des composantes de la membrane cellulaire. Nous avons montré que la réalisation de mesures FCS à différentes tailles de volumes d'observation permet de tracer les lois de diffusion des molécules dans les membranes des cellules vivantes. Notre méthode permet ainsi de distinguer entre différentes structures de confinement des particules de la membrane plasmique et de mesurer certaines de leurs caractéristiques, comme leur taille ou le temps de confinement moyen. Il a également été possible d'étudier la réorganisation de la membrane cellulaire au cours d'un événement de signalisation.

Abstract

Title : Molecular confinement and membrane organization of live cells : analysis of diffusion by fluorescence correlation spectroscopy

Our present description of the plasma membrane includes heterogeneities or mechanisms that may hinder the diffusion of membrane particles. Indeed, the diffusion of transmembrane proteins may be impeded by the actin-based membrane skeleton, whereas lipid microdomains are thought to transiently sequester molecules which are involved in signaling pathways. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a mature and powerful technique for measuring diffusion coefficients. However, the study becomes uneasy when the diffusion is not free as it is the case for the cell membrane components. We have shown that doing FCS measurements at different sizes of observation volumes gives access to the diffusion laws of molecules in live cell membranes. Our method enables to distinguish between different mechanisms responsible for the confinement of particles in the plasma membrane and to measure different characteristics of these confining structures, such as their size or the average confinement time. It has also been possible to study the reorganization of the cell membrane during a signaling event.

Résumé

Dans la description actuelle de la membrane plasmique, des hétérogénéités ou des mécanismes sont supposés empêcher la libre diffusion des particules membranaires. La diffusion des protéines transmembranaires serait ainsi ralentie par le réseau d'actine du cytosquelette, alors que les microdomaines lipidiques confinaient transitoirement les molécules impliquées dans les voies de signalisation. La spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) est une technique puissante permettant de mesurer des coefficients de diffusion. L'étude devient cependant malaisée lorsque la diffusion n'est pas libre, comme c'est le cas des composantes de la membrane cellulaire. Nous avons montré que la réalisation de mesures FCS à différentes tailles de volumes d'observation permet de tracer les lois de diffusion des molécules dans les membranes des cellules vivantes. Notre méthode permet ainsi de distinguer entre différentes structures de confinement des particules de la membrane plasmique et de mesurer certaines de leurs caractéristiques, comme leur taille ou le temps de confinement moyen. Il a également été possible d'étudier la réorganisation de la membrane cellulaire au cours d'un événement de signalisation.

Abstract

Title : Molecular confinement and membrane organisation of live cells : analysis of diffusion by fluorescence correlation spectroscopy

Our present description of the plasma membrane includes heterogeneities or mechanisms that may hinder the diffusion of membrane particles. Indeed, the diffusion of transmembrane proteins may be impeded by the actin-based membrane skeleton, whereas lipid microdomains are thought to transiently sequester molecules which are involved in signaling pathways. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a mature and powerful technique for measuring diffusion coefficients. However, the study becomes uneasy when the diffusion is not free as it is the case for the cell membrane components. We have shown that doing FCS measurements at different sizes of observation volumes gives access to the diffusion laws of molecules in live cell membranes. Our method enables to distinguish between different mechanisms responsible for the confinement of particles in the plasma membrane and to measure different characteristics of these confining structures, such as their size or the average confinement time. It has also been possible to study the reorganization of the cell membrane during a signaling event.